

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Genética



## **TESIS DOCTORAL**

¿Promueven las regiones cromosómicas específicas el apareamiento, sinapsis y recombinación de los cromosomas homólogos en meiosis?

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Nohelia Valenzuela Martínez**

Director

**Tomás Naranjo Pompa**

**Madrid, 2013**



Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Genética

# **¿Promueven regiones cromosómicas específicas el apareamiento, sinapsis y recombinación de los cromosomas homólogos en meiosis?**

Memoria  
que para optar al grado de doctora en Biología  
presenta

**Nohelia Valenzuela Martínez**

VºBº del Director de la Tesis

Fdo. Nohelia Valenzuela Martínez

Fdo. Tomás Naranjo Pompa

Madrid, Septiembre 2012



Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Genética

# **¿Promueven regiones cromosómicas específicas el apareamiento, sinapsis y recombinación de los cromosomas homólogos en meiosis?**

Memoria  
que para optar al grado de doctora en Biología  
presenta

**Nohelia Valenzuela Martínez**

VºBº del Director de la Tesis

Fdo. Nohelia Valenzuela Martínez

Fdo. Tomás Naranjo Pompa

Madrid, Septiembre 2012

*A mi familia*

*A José Antonio*

*A Magdalena por regalarme sus lindas sonrisas*



## AGRADECIMIENTOS

Han sido cuatro años los que he estado en este departamento desarrollando mi tesis, lo que no hubiese sido posible sin la beca que me adjudiqué en el 2008, por eso quiero agradecer al Gobierno de Chile por permitirme en parte cumplir este sueño.

Mencionar también que este trabajo ha sido financiado con el proyecto BFU2007-66544 de la Dirección General de Investigación, Ministerio de Educación y Ciencia de España.

En este tiempo he aprendido y crecido muchísimo, tanto en lo profesional como en lo personal. Sin duda, a lo largo de todo este proceso han estado presentes muchas personas que contribuyeron en él. Quiero agradecer en primer lugar al Dr. Tomás Naranjo por haberme guiado durante todo este tiempo, gracias a él me he encantado con la meiosis y con la citogenética, también quiero mencionar a su familia por hacer que la llegada a Madrid fuese más agradable, mostrándonos los sitios más conocidos de la ciudad.

No puedo olvidar agradecerle a la Dra. María Jesús Puertas por ponerme en contacto con el Dr. Tomás Naranjo, tras una llamada que hice desde Chile, cuando ella era la coordinadora del programa.

Gracias también a la Dra. Esther Perera por compartir conmigo sus conocimientos al inicio del proceso, sobretodo en mi primera temporada de meiosis.

Quiero agradecer a la Dra. Concepción Romero, directora del departamento de genética, por ayudarme y orientarme siempre que lo he necesitado. A todos los miembros de este departamento, profesoras y profesores, doctorandas (os) y técnicos, por facilitar y amenizar este proceso. Mencionar también al Dr. Juan Luis Santos por sus consejos en esta última etapa.

A mis compañeros de laboratorio de cito A, Mónica, Cecilia, Javier Varas, con los que compartí largas horas de trabajo y buenas conversaciones, en ocasiones al compás de la música. Igualmente a quienes trabajan en cito B, especialmente Myriam y María. A mis compañeras (os) Alberto, Diego, Javier Silva, Patricia, Beatriz, Naike, Roberto, Alejandra, Eduardo, a pesar de no ser de cito, compartimos de igual modo. Gracias por las conversaciones durante las comidas diarias o en las cenas varias, en las cuales nunca faltaba un buen motivo para juntarnos. Gracias también por su apoyo, por escucharme cuando estaba triste o feliz, por preocuparse por mis avances y por entregarme su amistad. Son momentos que siempre guardaré junto a mi familia española.

También quiero agradecer a aquellas personas que influyeron de una u otra forma en mi decisión de dedicarme a investigar y que ayudaron a desvelar mi vocación por la genética. Mi profesor guía de la carrera en Chile, Dr. Daniel Frías; también al Dr. Raúl Godoy por acogerme en su laboratorio un tiempo; al Dr.

Gonzalo Gajardo y a la Dra. Rosita Devés por sus consejos y por su apoyo. Especialmente a mi amigo el Dr. Luis Flores por su amistad, confianza y consejos desde pregrado hasta hoy. No me puedo olvidar de las personas que se han ido durante el tiempo que he estado en España, especialmente a Vinca Ramírez, quien fue una gran guía durante mi carrera, y pasó de ser una profesora a ser alguien muy importante en mi vida, incluso cuando ya estaba en Madrid no dejó de estar presente, fue muy duro perderla, sobre todo al estar tan lejos, gracias por todo lo que me enseñaste y compartiste conmigo.

A mis amigas y amigos repartidos por el mundo, que están siempre presentes y a los amigos que hice en España con los que pasamos agradables momentos, Vicky, Marcos, Gallego, Carla y Carlos. También agradecer a la familia de mi novio, que nos acompañó y compartió con nosotros en distintas etapas de este proceso.

Quiero hacer mención especial a mis padres, a quienes les debo mucho de lo que soy, gracias por amarme, por enseñarme a tener confianza en mí misma, por mostrarme lo que es la perseverancia, por alentarme a salir adelante, aún cuando pensaba que no iba a ser capaz, y a luchar por alcanzar mis sueños, por su apoyo siempre incondicional. Por su visita, tras dos años sin vernos, oportunidad en la que junto con acompañarme, mostraron interés por conocer mi trabajo. He recibido de ellos aquello que solo los padres pueden entregar.

Gracias a mi mejor amiga, mi hermana, quien me demostró que a pesar de los miles de kilómetros que nos separaban, cuando la necesité, para conversar o en momentos de angustia, siempre estuvo ahí, en aquellos momentos la distancia no fue evidente. Muchas gracias Valeska, Ángel y Magdalena por venir a verme, su visita fue un gran incentivo y sentí un gran apoyo a meses de acabar el doctorado.

Mención aparte merece Toño, mi novio, compañero y amigo, con quien emprendimos juntos este camino hace cuatro años en Chile, llenos de emoción, y ansias por todo lo que nos esperaba, y sobre todo por el comienzo de una nueva etapa juntos. Apoyándonos mutuamente, tanto en los mejores momentos, como en los no tan buenos. Su compañía y contención han sido fundamentales este tiempo, gracias por estar siempre, ser incondicional y también gracias por estar aquí conmigo. Hemos aprendido juntos que la vida de a dos es más fácil.

*"Gracias a la vida que me ha dado tanto"*

*Violeta Parra*

*"Don Quijote soy, y mi profesión la de andante caballería. Son mis leyes, el deshacer entuertos, prodigar el bien y evitar el mal. Huyo de la vida regalada, de la ambición y la hipocresía, y busco para mi propia gloria la senda más angosta y difícil. ¿Es eso, de tonto y mentecato?"*

*Don Quijote de la Mancha*

# ÍNDICE

<i>RESUMEN</i>	4
<i>INTRODUCCIÓN</i>	8
1. Significado genético de la meiosis	9
2. Procesos esenciales de la meiosis	11
2.1.- Apareamiento cromosómico	12
2.2.- Sinapsis	14
2.3.- Recombinación meiótica	15
3. Coorientación centrómerica en anafase I	18
4. Complejidad de la meiosis en los poliploides	20
5. Estructura cromosómica del trigo	22
6. Identificación y efecto del locus <i>Ph1</i>	22
7. Tolerancia a la manipulación cromosómica en trigo	24
8. Disposición de los cromosomas homólogos en células somáticas y premeióticas	25
9. Dinámica de los centrómeros en el comienzo de la meiosis	27
10. Dinámica de los telómeros en el comienzo de la meiosis, formación del bouquet	29
11. Mutantes que afectan a la formación del bouquet	31
12. Reconocimiento de los homólogos: Mecanismo dependiente de recombinación	31
13. Reconocimiento de los homólogos: Mecanismo independiente de recombinación; Centros de apareamiento (PCs de "Pairing center")	32
14. Puntos calientes para la recombinación	33
15. Localización de quiasmas en plantas	34

<b>OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>40</b>
1. Material	41
1.1.- Plantas empleadas en el análisis del cromosoma 5R	41
1.2.- Plantas utilizadas en el análisis del brazo 1RL	42
1.3.- Plantas utilizadas en el análisis de los brazos 1RS, 1BS, 2RL, 2BL	42
2. Técnicas para la observación de cromosomas por microscopía	47
2.1.- Obtención de raíces y anteras	47
2.2.- Preparaciones citológicas para la hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia	48
2.3.- Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia	49
2.4.- Detección de la hibridación	51
2.5.- Microscopía de fluorescencia y procesamiento de imágenes	52
<b>RESULTADOS</b>	<b>53</b>
1. Análisis del cromosoma 5R de centeno	54
1.1.- La delección presente en 5RL afecta a la sinapsis de 5RS	54
1.2.- La posición del brazo 5RS en el bouquet condiciona su sinapsis	58
1.3.- Efectos opuestos de la delección en la frecuencia de quiasmas de los dos brazos del cromosoma 5R	61
2. Análisis del brazo 1RL de centeno	62
2.1.- Marcadores del cromosoma 1R	62
2.2.- La posición de los sobrecruzamientos en el brazo 1RL	63
2.3.- Dinámica del centrómero y marcador distal en profase I temprana y media	68
2.4.- Desarrollo de la sinapsis en el par de cromosomas de centeno	72
3. Análisis de las líneas de translocación 1BS/1RS y 2BL/2RL	77
3.1.- Sinapsis y recombinación en las plantas con translocación 1RS/1BS	79
3.2.- Sinapsis y recombinación en las plantas con translocaciones 2RL/2BL	87

<i>DISCUSIÓN</i>	<i>94</i>
1. El bouquet propicia interacciones entre las regiones homólogas	95
2. Papel que desempeñan las regiones específicas de DNA de los cromosomas estudiados en el apareamiento, sinapsis y recombinación	96
2.1.- Cromosoma 5R	97
2.2.- Brazo cromosómico 1RL	99
2.3.- Cromosomas de las líneas de translocación: brazo cromosómico de centeno 1RS y brazo cromosómico de trigo 1BS	101
2.4.- Cromosomas de las líneas de translocación: brazos cromosómicos 2RL y 2BL	103
3.- Efecto de la estructura cromosómica en el reconocimiento de los cromosomas homólogos	104
4.- Corrección del apareamiento cromosómico y de la sinapsis	106
<i>CONCLUSIONES</i>	<i>108</i>
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	<i>111</i>
<i>ANEXOS</i>	<i>129</i>

## **RESUMEN**

## RESUMEN

La meiosis es un tipo especializado de división celular que permite a los organismos con reproducción sexual producir gametos haploides y, por tanto, mantener su número cromosómico generación tras generación. La reducción del número cromosómico depende de la formación de bivalentes entre los pares de cromosomas homólogos en profase I y su posterior segregación en anafase I. La formación de bivalentes se produce como consecuencia del apareamiento, sinapsis y recombinación de los cromosomas homólogos durante la profase I de la primera división meiótica. Los cromosomas homólogos ocupan territorios nucleares separados en el núcleo premeiótico y deben aproximarse para poder interactuar y reconocerse. Cuando esto sucede se alinean, y llevan a cabo la sinapsis y la recombinación. El mecanismo por el cual los cromosomas se aproximan y reconocen es el menos conocido de la meiosis. Las aportaciones a su conocimiento representarán un papel fundamental en la ciencia básica, y también en la aplicada, por la importancia biológica que les confiere su repercusión directa en la reproducción, la fertilidad y la generación de variabilidad genética. En esta investigación se ha llevado a cabo un análisis de las causas del apareamiento, sinapsis y recombinación entre cromosomas homólogos de centeno y de trigo en los que la iniciación de la sinapsis y la recombinación tienen una localización distal muy marcada. Específicamente, pretendíamos averiguar si el reconocimiento entre homólogos es atribuible o no a secuencias de DNA con una localización definida en los cromosomas de trigo y centeno. Para realizar esta investigación hemos utilizado líneas de trigo que contienen cromosomas completos o segmentos cromosómicos de centeno, una de estas líneas fue la línea de adición trigo-5R con el cromosoma 5R de centeno y otra derivada de ella con una delección del 70% distal del brazo largo. Otra línea involucra al cromosoma 1R de centeno o a su brazo largo 1RL. Se han empleado las líneas con la estructura normal de estos cromosomas o con una inversión del 95% del brazo 1RL. También se han utilizado líneas de translocación trigo-centeno entre los brazos 1RS y 1BS o entre los brazos 2RL y 2BL en las que el segmento translocado variaba en tamaño de unas líneas a otras. El cromosoma translocado se hacía acompañar bien del cromosoma de trigo intacto (1B o 2B) o de un cromosoma que lleva completo el brazo de centeno

afectado (1RS o 2RL), siendo de trigo el otro brazo (cromosomas 1BL.1RS o 2BS.2RL respectivamente). En estas líneas, se ha seguido mediante FISH el desarrollo de la sinapsis de los cromosomas de centeno y se ha cuantificado la formación de quiasmas a partir de las asociaciones cromosómicas en metafase I o la identificación de cromosomas recombinantes en anafase I.

Hemos encontrado que, en el brazo 5RL, el apareamiento no depende de secuencias específicas localizadas en una región concreta, sino que cualquier región del mismo puede participar en la búsqueda de homología. No obstante, la región proximal de dicho brazo posee una capacidad muy reducida de formar sobrecruzamientos, que se concentran principalmente en su mitad distal. La inversión del brazo cromosómico 1RL produce un cambio en la posición de los quiasmas desde la región distal a la proximal. Se ha identificado una región equivalente al 10% distal del brazo 1RL que alberga el 70% de los sobrecruzamientos producidos en él. Esta región rica en sobrecruzamientos es más eficaz en la búsqueda y reconocimiento de los homólogos que las regiones pobres en sobrecruzamientos. Es decir, el apareamiento, sinapsis y recombinación serían dependientes de secuencias de DNA.

Las regiones distales de los brazos 1RS y 2RL tienen también un papel relevante en el reconocimiento de los homólogos y en el desarrollo de la sinapsis. La mayoría de los sobrecruzamientos producidos en esos brazos se localizan en una zona distal que oscila entre el 10% y el 15% del tamaño de dichos brazos. El brazo cromosómico 2RL forma más sobrecruzamientos que el 2BL a pesar de que la longitud genética de 2RL, estimada en plantas de centeno, es bastante menor que la de 2BL en plantas de trigo.

La configuración cromosómica aparece como un factor condicionante del movimiento de aproximación de los cromosomas homólogos durante la formación del bouquet. Los telómeros del par de brazos 5RS tienen más dificultades para converger en el polo telomérico cuando 5RS se conecta con un brazo 5RL normal que cuando lo hace con un brazo 5RL deletado.

Si la formación del bouquet produce un acercamiento de los cromosomas, los movimientos cromosómicos causantes de la desintegración del bouquet contribuyen también a la separación de asociaciones homólogas incorrectas e



inestables. La dispersión de los telómeros puede actuar como un elemento corrector del apareamiento cromosómico.

## **INTRODUCCIÓN**

# INTRODUCCIÓN

## 1. Significado genético de la meiosis

La reproducción sexual es una estrategia reproductiva que ofrece a los organismos vivos un mecanismo de mezcla genética que fomenta su diversidad. Esta estrategia está altamente conservada en organismos eucariotas e indudablemente está ligada al mecanismo de la meiosis (Pollard et al., 2007). La meiosis es el tipo de división celular que conduce a la producción de gametos con dotación cromosómica haploide. Consiste en la sucesión de dos divisiones que ocurren después de una ronda de replicación o fase S. En una célula que entra en meiosis, los cromosomas homólogos, uno de origen materno y otro paterno, se encuentran separados en la mayoría de los organismos, luego interactúan entre sí, se aparean y recombinan produciéndose al menos un sobrecruzamiento por cromosoma. Dicho sobrecruzamiento asegura la correcta segregación de los cromosomas homólogos en anafase de la primera división meiótica (también llamada división reduccional). A ésta le sigue una segunda división meiótica (también llamada división ecuacional), en la que segregan las cromátidas hermanas de cada cromosoma. Como no hay una fase S entre ambas divisiones, el resultado son gametos con la mitad de la dotación cromosómica que tenía la célula meiótica original.

La meiosis es clave, por un lado, para que los organismos que se reproducen sexualmente, reduzcan la dotación cromosómica a la mitad, previamente a que se lleve a cabo la fecundación. Cuando esta ocurre, los dos gametos haploides se fusionan y forman un cigoto, restituyendo el número cromosómico diploide de la especie. Por otro lado, la meiosis contribuye a formar nuevas combinaciones de alelos, debido a los eventos de intercambio genético entre cromosomas homólogos producidos en profase I. Estas nuevas combinaciones amplían la diversidad genética sobre la cual puede actuar la selección natural (Cnudde y Gerats, 2005).

La primera división meiótica consta de cuatro etapas distintas, profase I, metafase I, anafase I y telofase I. A su vez, la profase I se subdivide en cinco estadios, leptotena, cigotena, paquitena, diplotena y diacinesis.

Entre el fin de la fase S y el comienzo de leptotena las hebras molde entre los bucles de las cromátidas hermanas, son reforzadas con proteínas específicas de meiosis para formar el elemento axial (AE, de “Axial element”) del complejo sinaptonémico (SC, de “Synaptonemal complex”), a partir del cual los bucles condensados de las cromátidas hermanas se extienden en direcciones opuestas (Stack y Anderson, 2001). Los cromosomas en leptotena son más largos que en cualquier otra etapa de la meiosis, producto de la remodelación de la cromatina que causa su alargamiento, el EA probablemente representa su sostén más rígido (Schertan et al., 1998). Asimismo, se inicia el proceso de recombinación por la formación de las dobles roturas en las moléculas de DNA (DSBs de “Double-strand breaks”). En la transición entre leptotena tardía y cigotena temprana, los cromosomas homólogos se mueven activamente en el núcleo, y es probable que esto ayude a que los homólogos entren en contacto para poder reconocerse y alinearse en preparación para la sinapsis (formación del SC). También, los cromosomas adoptan la configuración en bouquet por agrupamiento de los telómeros (Schertan, 2001). En cigotena, los cromosomas homólogos se sitúan muy próximos, dando lugar al apareamiento homólogo. Cuando la distancia entre los homólogos es la adecuada se produce la instalación del elemento central (CE, de “Central element”) del SC entre los AEs que pasan a denominarse elementos laterales (LEs, de “Lateral element”). En paquitena los cromosomas homólogos están estrechamente asociados pues la sinapsis ya se ha completado (Zickler y Kleckner, 1998). También se completa la reparación de DSBs, algunas de las cuales dan lugar a sobrecruzamiento (CO, de “Crossover”) y otras a conversión génica. Además, se produce un aumento progresivo de la condensación de la cromatina. La desaparición del SC marca el fin de paquitena y el comienzo de diplotena. Este último suceso va acompañado de una condensación de la cromatina que permitirá la observación citológica del resultado del CO, es decir, el quiasma. En diplotena continúa la condensación de la cromatina, permaneciendo los cromosomas asociados por los quiasmas. Finalmente, en diacinesis, los cromosomas alcanzan el estado final de condensación y comienza la desintegración de la membrana nuclear y el nucléolo.

Durante metafase I los bivalentes se disponen alineados en el plano ecuatorial de la célula con los centrómeros homólogos orientados a polos opuestos

del huso. Es decir, los cinetocoros de las cromátidas hermanas están unidos a microtúbulos que proceden del mismo polo. En anafase I la cohesión entre las cromátidas hermanas se pierde en los brazos, pero no en los centrómeros, lo que favorece la eliminación de los quiasmas. De esta manera los cromosomas homólogos migran a polos opuestos. Finalmente en telofase I, se reconstituye la membrana nuclear. A continuación en intercinesis, una interfase modificada, donde no hay síntesis de DNA ni reorganización de la estructura cromosómica, que tiene lugar entre las dos divisiones meióticas, los cromosomas se descondensan, se desenrollan y también se alargan.

La segunda división meiótica consta de cuatro fases: profase II, metafase II, anafase II y telofase II en las que los cromosomas se comportan de manera similar a como lo hacen en mitosis. En metafase II los cromosomas están alineados en el centro de la célula y mantienen sus cromátidas unidas mediante conexiones céntricas. A continuación, en respuesta a las señales de regulación, se desencadena el comienzo de anafase II, momento en el que las conexiones intercromatídicas residuales desaparecen y como resultado ocurre la disyunción de las cromátidas. Los cromosomas de cada célula se van a separar en un juego de cromátidas a cada polo, que luego quedarán incluidas en cada uno de los productos meióticos.

## **2. Procesos esenciales de la meiosis**

La reducción del número cromosómico durante la primera división meiótica está propiciada por la asociación de cada par de cromosomas homólogos en un bivalente, durante la profase I, y su disociación en anafase I.

La formación de bivalentes implica que los cromosomas homólogos se dispongan muy próximos entre sí para que puedan interaccionar. A menudo, se disponen en paralelo a lo largo de toda su longitud, proceso que recibe el nombre de apareamiento. Esa asociación inicial se consolida en una asociación física con la formación del complejo sinaptonémico, que los mantiene unidos a lo largo de toda su longitud. La aproximación entre los cromosomas homólogos les permite intercambiar material genético a través de la reparación por recombinación de las dobles roturas producidas en las moléculas de DNA al comienzo de la meiosis, proceso denominado recombinación homóloga. El intercambio recíproco de material genético producido entre los cromosomas homólogos (denominado

sobrecruzamiento), da lugar a la formación del quiasma. Los quiasmas junto con la cohesión entre cromátidas hermanas, mantienen unidos a los homólogos de cada bivalente hasta anafase I. La orientación al mismo polo de los cinetocoros hermanos, o coorientación centromérica, hace posible que los cromosomas homólogos segreguen a polos opuestos en anafase I. A continuación desarrollaremos en más detalle las características de cada uno de estos procesos.

### **2.1.- Apareamiento cromosómico**

Ocurre durante la etapa inicial de la profase I y solapa, en parte, con la recombinación y la sinapsis (Bozza y Pawlowski, 2008). El apareamiento es un proceso de acercamiento progresivo e interacción homóloga que supone un incremento gradual de asociaciones físicas entre homólogos que culmina en una estable y estrecha yuxtaposición de los mismos a lo largo de su longitud (Gerton y Hawley, 2005). Para que el apareamiento se lleve a cabo los cromosomas deben superar obstáculos tales como:

- Los cromosomas homólogos pueden estar espacialmente separados dentro del núcleo al comenzar la meiosis (Maestra et al., 2002)
- La compacta heterocromatina puede causar dificultades para el acercamiento en el momento del reconocimiento por homología.
- Las secuencias repetidas de ADN pueden ocultar la homología correcta y conducir a interacciones de apareamiento ectópico.

Por tanto, el apareamiento entre los cromosomas debe incluir varios estadios. En primer lugar, deben quedar relativamente próximos y co-alineados, es decir, deben estar polarizados dentro del núcleo de tal forma que los brazos estén dispuestos en paralelo. Este alineamiento homólogo es un proceso que se activa al comienzo de la profase meiótica. Generalmente está mediado por asociaciones entre los extremos de los cromosomas y la membrana nuclear. Fruto de esta asociación, los telómeros de los cromosomas pueden interaccionar con elementos del citoesqueleto y desplazarse a una región pequeña de la membrana nuclear. En dicho lugar, se agrupan haciendo que los cromosomas adopten una organización en ramillete o bouquet. Esta polarización de los telómeros hace posible que regiones homólogas se dispongan igualmente distantes respecto a los telómeros. De esta manera, quedan alineados en paralelo una vez aproximados. En segundo

lugar, la homología debe ser establecida por medio de la búsqueda de secuencias complementarias en el DNA de cromosomas homólogos o por otro mecanismo. Finalmente, las interacciones de apareamiento ectópicas que involucran secuencias repetidas de DNA, como transposones, deben ser eliminadas. Así, se puede establecer una asociación homóloga correcta a lo largo de todo el cromosoma (Bozza y Pawlowski, 2008). Es importante resaltar que las interacciones inadecuadas que puedan darse entre cromosomas han de ser eliminadas antes de hacerse permanentes (Kleckner, 1996). Por este motivo, el alineamiento juega un papel doble: promover las interacciones entre homólogos y restringir las asociaciones ectópicas (Bhalla y Dernburg, 2008). Finalmente, cuando las interacciones de apareamiento están establecidas en múltiples puntos entre los dos cromosomas, el resultado es una asociación íntima a lo largo de toda su longitud.

La reorganización de los cromosomas en el núcleo durante la formación del bouquet da lugar a que los extremos de los cromosomas se alojen en un mismo volumen bastante menor del que ocupaban antes de agruparse. Esto supone un acercamiento real de los homólogos y de ahí que se haya postulado el bouquet como mecanismo que facilita el apareamiento. De hecho mutantes defectuosos en la formación del bouquet, muestran un apareamiento ralentizado e ineficiente (Bozza y Pawlowski, 2008).

La reducción de la distancia entre los cromosomas homólogos les permite interactuar y reconocerse. El reconocimiento que conduce al apareamiento efectivo puede efectuarse mediante dos tipos de mecanismo, mecanismo dependiente de la recombinación y mecanismo independiente de la recombinación (Bhalla y Dernburg, 2008). El reconocimiento de los homólogos basado en la recombinación, explota la comparación de secuencias producidas al buscar entre secuencias de doble hebra la que puede ser utilizada como molde en la reparación de una doble rotura. Esa búsqueda de molde la realizan cadenas sencillas de DNA resultantes de cada doble rotura que invaden la molécula doble homóloga en una secuencia equivalente, según un proceso que se describe más adelante en mayor detalle. El reconocimiento de los homólogos puede producirse por mecanismos independientes de la recombinación como son los centros de apareamiento de *Caenorhabditis elegans* o de *Drosophila melanogaster*, que serán

considerados más adelante, o la asociación homóloga promovida por la síntesis de un RNA no codificante como sucede en *Schizosaccharomyces pombe* (Ding et al., 2012).

## **2.2.- Sinapsis**

La sinapsis es un proceso en el que se consolida la asociación de los dos cromosomas homólogos mediante la instalación entre ellos del SC. El SC es una estructura tripartita que está formada por dos LEs conectados por una región central.

La presencia y progresión de la sinapsis han sido inferidas mediante experimentos realizados por microscopía electrónica o por inmunolocalización de las proteínas que componen el SC. En una célula que tiene meiosis normal la sinapsis ocurre después del apareamiento y usualmente es entre homólogos. Diversos estudios efectuados en eucariotas, incluyendo plantas modelo como *Arabidopsis* y maíz, sugieren que la terminación del apareamiento de los cromosomas homólogos está íntimamente ligado a la progresión de la sinapsis (Tiang et al., 2012 y referencias incluidas). En contraposición, en ciertos mutantes que son defectuosos para el apareamiento homólogo, puede tener lugar una sinapsis entre cromosomas que no son homólogos (Pawlowski y Cande, 2005).

Como la meiosis puede ocurrir en ausencia de sinapsis, por ejemplo en *Schizosaccharomyces pombe* (Bähler et al., 1993; Cnudde y Gerats, 2005), el papel más importante que puede desempeñar el SC no ha sido todavía definido, pero se piensa que puede tener considerable influencia sobre el número y distribución de los eventos de recombinación recíproca a lo largo del cromosoma. De esta manera, también influiría en la formación de quiasmas estables, que permitan una disyunción adecuada de los homólogos en anafase I (Sym y Roeder, 1994; Heyting, 1996). Asimismo, en la mayoría de los organismos, mantiene unidos a los homólogos durante el proceso de compactación y condensación que sucede en la transición de leptotena a cigotena (Zickler y Kleckner, 1999).

La formación del SC comienza en leptotena con el desarrollo del AE. Este se desarrolla entre las cromátidas hermanas de un cromosoma. Conforme avanza la cigotena, los AEs derivados de los cromosomas homólogos quedan estrechamente conectados entre sí a lo largo de toda su longitud por los filamentos transversos,



que se sitúan entre ellos para estructurar el SC. Dentro del SC maduro, en paquitena, los LEs están separados el uno del otro por una distancia uniforme de 100 nm (Roeder, 1997). Entre los dos elementos laterales se forma una tercera estructura longitudinal, el CE, compuesta de filamentos transversos a los que se asocian otras proteínas (Costa y Cooke, 2007). Cada SC está rodeado por los bucles de cromatina anclados a los LEs de cada cromosoma. En diplotena, el SC se desintegra y los cromosomas homólogos se separan, salvo donde se encuentran los quiasmas, permaneciendo unidos solo en estos sitios. (Page y Hawley, 2004; Cnudde y Gerats, 2005).

En muchas plantas la sinapsis comienza en o cerca de los telómeros, mientras que en *Saccharomyces cerevisiae* se inicia en distintos sitios a lo largo del cromosoma. En levaduras, la proteína Zip3, es el componente clave en los sitios de inicio del SC. Agarwal y Roeder (2000) presentan evidencia contundente en apoyo al modelo en el cual, en levadura, la proteína Zip3 que forma parte del AE, promueve el reclutamiento de otra proteína del AE, Zip2, y ambas Zip3 y Zip2 reclutan a Zip1 que forma los filamentos transversos.

### **2.3.- Recombinación meiótica**

La recombinación meiótica es necesaria para producir variabilidad genética, pero también lo es para proporcionar un mecanismo de estabilidad a los cromosomas apareados, después de la desintegración del complejo sinaptonémico y hasta la segregación cromosómica en anafase I.

Las principales etapas del mecanismo de recombinación han sido descubiertas en levaduras y están conservados en otros eucariotas (Hunter, 2007). En muchos organismos la recombinación meiótica se inicia con la formación de un conjunto de DSBs programadas y catalizadas por SPO11, una enzima relacionada con la topoisomerasa II, cuya función es necesaria para que se produzca el apareamiento y la segregación de los cromosomas homólogos en numerosas especies (Lange et al., 2011). Ciertos tipos de organización de la cromatina podrían ser específicos para meiosis o facilitar la recombinación. Algunos podrían promover la formación de DSBs, mientras que otros podrían promover la reparación de las roturas. En relación a esto, se ha encontrado en levaduras que la ubiquitinación de la histona H2B es necesaria para el reclutamiento y la

estabilización de la maquinaria que contiene SPO11. Por otro lado, como sucede en mamíferos, las zonas que contienen DSBs son señaladas mediante la fosforilación de una variante de la histona H2AX ( $\gamma$ -H2AX) (Hunter et al., 2001).

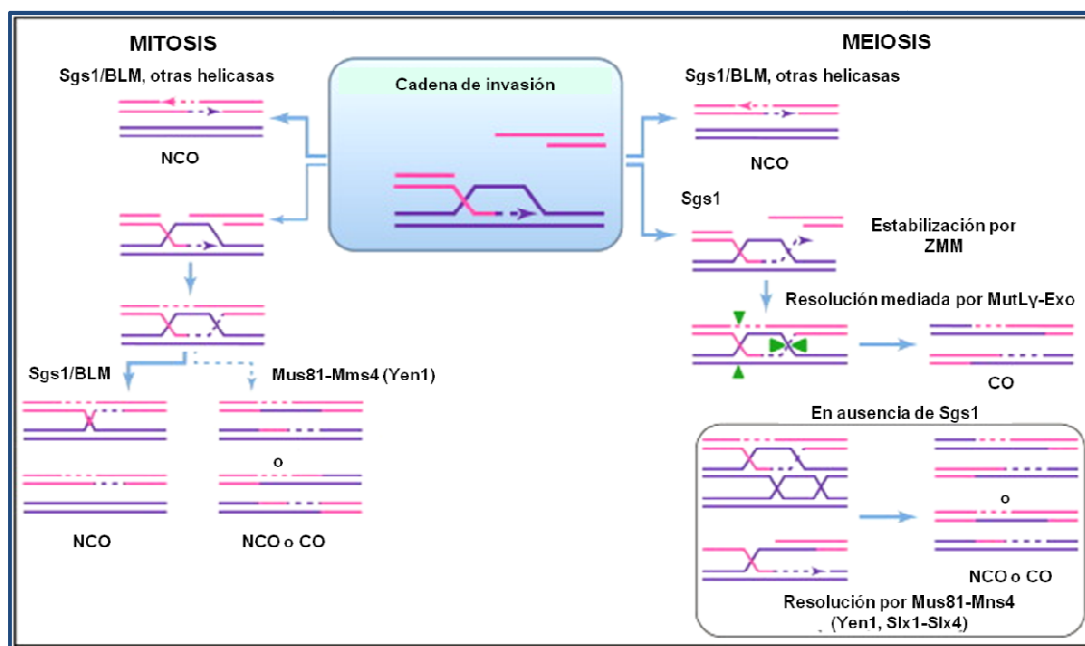
Se piensa que la proteína SPO11 genera las DSBs utilizando un mecanismo de transesterificación. En levaduras, es la cadena lateral de la Tyr135 de SPO11 la que lleva a cabo un ataque nucleolítico sobre los enlaces fosfodiéster del DNA. En el curso de esta reacción el fosfato del extremo 5' del DNA queda unido covalentemente a la tirosina a través de un enlace fosfodiéster, generando así una unión entre la enzima y el DNA y un corte en la cadena de DNA. Se prevé que los ataques nucleolíticos ocurren simultáneamente en ambas cadenas de ADN, generando así la DSB. A continuación, los extremos 5' de las DSBs son objeto de una actividad nucleolítica que libera a SPO11. Finalmente, a través del complejo de proteínas de recombinación, denominado complejo MRX, las roturas son removidas en dirección 5' a 3', generando extremos 3' de cadena sencilla. En levaduras, el complejo MRX contiene proteínas de reparación de DNA (p. ej., Rad50, Mre11 y Xrs2). El proceso de recombinación comienza cuando las cadenas simples de DNA generadas de forma coordinada por SPO11 y el complejo MRX, invaden la doble cadena de DNA homóloga para formar uniones heteroduplex (Schwacha y Kleckner, 1994; Hunter y Kleckner, 2001). Este proceso es facilitado por la mediación de otro complejo de proteínas de recombinación, homólogos de RecA, denominadas Rad51 y Dmc1, esta última exclusiva de meiosis. Luego Dmc1 unida a la hebra sencilla de DNA inicia la búsqueda de una secuencia complementaria de DNA, localizada en una de las cromátidas no hermanas del cromosoma homólogo. Una vez que esto ha ocurrido, se produce un heteroduplex. Después de la síntesis del DNA cebador, la hebra invasora puede ser desplazada e hibridada al otro extremo de la DSB. Esto da lugar a no sobrecruzamiento (NCO de “Non-crossover”) o conversión génica, una vía que es conocida como vía de hibridación dependiente de síntesis de hebra (SDSA de “Synthesis-dependent strand annealing”). Esta vía está determinada por la acción de la proteína Sgs1, una helicasa homóloga de la proteína BLM humana (Klein y Symington, 2012; De Muyt et al., 2012; Zakharyevich et al., 2012).

Alternativamente, se forman dos intermediarios secuenciales. El primero es un intermediario de invasión de hebra sencilla (JMs de “Joint molecules”) que se

estabiliza gracias a la acción del complejo proteico ZMM. Este complejo ZMM, está formado por las proteínas Zip1, Zip2, Zip3, Zip4, Mer3, Msh4, Msh5 y Spo16. A continuación, la hebra invasora desplaza a la hebra no complementaria, para formar una estructura en lazo D. La hebra invasora crece mediante la síntesis de ADN, de modo que la hebra desplazada es capaz de interaccionar con el segundo extremo 3' procedente del procesamiento de la DSB. Tras la captura del otro extremo de la DSB, se rellenan las secuencias que se habían perdido al procesar los extremos y se ligan para formar un doble intermediario de Holliday (dHJ de “Double Holliday junction intermediate”). Posteriormente, el intermediario de Holliday se resuelve para formar un CO.

Los primeros modelos sobre recombinación suponían que los dHJs podían ser resueltos indistintamente como COs o NCOs. Sin embargo, el análisis molecular de los intermediarios de recombinación indicó que los dHJs son procesados para formar mayoritariamente COs bajo el control de *cdc5* una proteína relacionada con la quinasa polo (Allers y Lichten, 2001). La naturaleza de las resolvasas que deshacen las dHJs en las células meióticas ha sido establecida en levaduras normales y mutantes para la proteína Sgs1. En los mutantes *sgs1*<sup>-</sup> se produce una acumulación de intermediarios de recombinación entre los que abundan productos aberrantes derivados de interacción entre más de dos cromátidas. Estos intermediarios son resueltos como COs o NCOs bajo la acción de *cdc5*. Su resolución depende en primer lugar del complejo Mus81-Mms4 activado por *cdc5* (Matos et al., 2011). En ausencia de este complejo interviene otra resolvasa Yen1 y, si falla ésta, también interviene una tercera Slx1-Slx4. En células con proteína Sgs1, esta vía que se acaba de descubrir representa aproximadamente el 20% de toda la actividad recombinadora. La mayoría de los dHJs producidos en presencia de la proteína Sgs1 son el resultado de una interacción de esta proteína con dos del grupo ZMM y son resueltos por otra resolvasa MutLγ (homólogo de Mlh1-Mlh3) que actúa cooperativamente con la nucleasa Exo1 (De Muyt et al., 2012; Zakharyevich et al., 2012). La proteína Sgs1 aparece así como un regulador importante en la decisión que hace que una DSB sea procesada por la vía de CO o de NCO (Klein y Symington, 2012) y esta decisión se toma en la transición leptotena-cigotena (Börner et al., 2004). En las células mitóticas la regulación de

las vías de recombinación está relacionada también con Sgs1, pero tiene unos resultados diferentes como se puede apreciar en la figura 1.



**Figura 1.** Muestra los papeles de la proteína Sgs1 en la formación de no sobre-cruzamientos y sobre-cruzamientos. En células en mitosis, la recombinación basada en la reparación de las dobles roturas resulta en un intermediario por invasión de una cadena a una cadena doble, que puede ser desenrollado por Sgs1/BLM o por otras helicasas para prevenir los COs. Si la invasión perdura y conduce a un intermediario de dHJ, éste es resuelto por Sgs1/BLM en conjunto con la topoisomerasa 3 y factores adicionales que también producen NCOs. Las moléculas de dHJ que escapan a la acción de Sgs1 son resueltas por Mus81-Mms4 o Yen1 de un modo aleatorio. En meiosis, Sgs1 tiene tres papeles. Primero, invierte la invasión de una hebra para formar NCO. Segundo, de un modo pro-CO, previene la formación de moléculas de invasión de cadenas multicromátidas y promueve la asociación de algunas cadenas intermediarias de invasión, legítimas, con el complejo de estabilización ZMM. Estas moléculas son eventualmente resueltas solo de un modo conducente a CO, principalmente por MutLy-Exo1. Las moléculas observadas en ausencia de Sgs1 son objetivo de Mus81-Mms4, Yen1, y Slx1-Slx4, que se resuelven de un modo aleatorio para dar como resultado CO y NCO (*Adaptado de Klein y Symington, 2012*)

### 3. Coorientación centrómerica en anafase I

La correcta segregación cromosómica es indispensable para la viabilidad de organismos y células, ya que los errores que se pueden producir son irreversibles y causan aneuploidía (Compton, 2007). La segregación cromosómica requiere una serie de eventos dinámicos, conducentes a la congregación de los bivalentes en el plano ecuatorial de la célula, y a la separación de los cromosomas homólogos en anafase I.

Para que se produzca una correcta segregación cromosómica, los organismos eucariotas han desarrollado varias estructuras: a) el huso, una máquina compleja de microtúbulos; b) el centrómero, región cromosómica

especializada que contiene los cinetocoros de ambas cromátidas a los que se produce el anclaje de los microtúbulos del huso y c) la cohesión de las cromátidas hermanas, enlace que se forma durante la replicación de DNA y que las mantiene unidas longitudinalmente (Cnudde y Gerats, 2005).

El cinetocoro está formado por proteínas específicas que se unen al DNA en la zona centromérica y facilitan su unión a los microtúbulos. Se han descrito como proteínas cinetocóricas que se unen al DNA: CENH3 (“centromeric histone H3”), que reemplaza a la histona H3 normal en los nucleosomas de los centrómeros y CENPC (“Centromeric protein C”).

La cohesión entre las cromátidas hermanas corre a cargo de las cohesinas que forman parte del LE del SC. El LE del SC proporciona también el soporte para que los cinetocoros hermanos se localicen uno junto al otro. Esto hace posible que en el momento en que el huso comienza a formarse, los cinetocoros hermanos unificados estén y pasen a ser la estructura responsable de la segregación reduccional por su unión a los microtúbulos de un solo polo (Li y Dawe, 2009).

En diacinesis, los dos cromosomas homólogos pueden unirse a microtúbulos del huso del mismo polo o de polos opuestos. Solo los bivalentes que están adheridos a microtúbulos de polos opuestos logran una configuración estable que se mantiene hasta anafase I. Si los bivalentes se unen a microtúbulos del mismo polo, se disocian de ellos y vuelven a intentar unirse correctamente (Roeder, 1997; Cnudde y Gerats, 2005).

Los quiasmas que mantienen unidos a los homólogos facilitan que los cinetocoros hermanos se adhieran a los microtúbulos que emanan del mismo polo del huso. Una vez, que la coorientación es lograda y los cinetocoros hermanos actúan como uno, la tensión generada por la unión a los microtúbulos estabiliza la orientación de los bivalentes (Brar y Amon, 2008). En *S. cerevisiae* la coorientación de los cinetocoros depende de su conexión con una única proteína denominada monopolina (Tóth et al., 2000). En otros organismos esa coorientación está producida por otro mecanismo en que aparece implicada la proteína rec8, subunidad de la cohesina meiótica. Cuando se produce la entrada en anafase I, el complejo promotor de anafase provoca la eliminación de rec8 y la separación de las cromátidas hermanas a lo largo de todo el cromosoma excepto en la región pericentromérica. En esta región, rec8 está protegida por otra proteína

denominada Shugosina y no se produce pérdida de cohesión entre las cromátidas hermanas (Kitajima et al., 2004; Rabitsch et al., 2004).

En todos los eucariotas, los microtúbulos se unen a los cinetocoros mediante el complejo proteico NDC80. Este complejo interactúa a su vez con el complejo MIS12, el cual se une indirectamente con las proteínas CENH3 y CENPC. Estudios realizados en mutantes de maíz han permitido comprobar que el complejo NDC80-MIS12 forma un puente que conecta los dos cinetocoros hermanos determinando su orientación hacia el mismo polo (Li y Dawe, 2009).

Se piensa que la tensión ejercida por los microtúbulos sobre cada cromosoma homólogo es la señal de una exitosa fijación bipolar y el desencadenante de la disolución de la cohesión entre cromátidas hermanas para iniciar la anafase I (Ault y Niklas, 1989). La importancia de esta tensión ha sido demostrada aplicando una tensión opuesta a dos homólogos unidos al mismo polo del huso, mediante micro-manipulación (Ault y Niklas, 1989). En esa situación, la adhesión monopolar, de otro modo inestable, consigue ser estabilizada (Niklas, 1974; Ault y Niklas, 1989).

Se ha propuesto que la tensión es convertida en una señal química en el cinetocoro mediante la acción de la proteína quinasa llamada aurora B, que es sensible a la tensión. Cuando dicha proteína detecta falta de tensión, fosforila a la proteína del cinetocoro Dam1, que está implicada en la unión entre el centrómero y los microtúbulos. Tras esta fosforilación, la proteína no puede mantener un ensamblaje correcto a los microtúbulos, facilitando que se desprendan de los cinetocoros (Li et al., 2002; Wang et al., 2007). Una vez conseguida la tensión (ya sea natural o artificialmente), la proteína del cinetocoro se desfosforila, lo que se traduce en una señal que permite seguir avanzando hacia la división (Niklas et al., 1995).

#### **4. Complejidad de la meiosis en los poliploides**

La correcta segregación de los cromosomas es especialmente exigente en especies poliploides. Estas son especies que contienen más de dos juegos cromosómicos, que deben repartirse equitativamente para producir gametos equilibrados genéticamente (Cifuentes et al., 2010). La poliploidía ha jugado un papel importante en la evolución de las plantas superiores, de hecho, se ha

estimado que alrededor del 70% de las angiospermas han experimentado uno o más episodios de poliploidización durante el curso de su evolución (Masterton, 1994).

Los poliploides surgen de dos maneras: los denominados autopoliploides, por una multiplicación básica de un juego de cromosomas, los alopoliploides por la hibridación entre dos especies distintas, pero todavía relacionadas, y posterior duplicación cromosómica. Una vez formadas, las nuevas plantas poliploides se enfrentan a un inmediato desafío durante la meiosis. Los diferentes conjuntos de cromosomas son, por lo general, suficientemente similares entre sí, como para que la recombinación puede dar lugar a complejas configuraciones meióticas. Estas pueden conducir a la formación de gametos desequilibrados, y progenies aneuploides (Mestiri et al., 2010) o a la aparición de reordenamientos cromosómicos (Szadkowski et al., 2010), que también pueden ocasionar problemas de fertilidad (Gaeta y Pires, 2010). Para producir gametos viables, los poliploides deben comportarse durante la meiosis como si fueran diploides. La diploidización citológica, es el proceso por el cual la meiosis de los poliploides conduce a la producción de gametos cromosómica y genéticamente equilibrados. Es considerada como un paso crítico en la especiación poliploide y difiere según se trate de especies autopoliploides o alopoliploides (Cifuentes et al., 2010).

En autopoliploides con tres o más conjuntos de cromosomas, se pueden producir multivalentes en metafase I, cuya segregación en anafase I puede dar lugar a gametos aneuploides y esterilidad. Este problema tiene difícil solución cuando se trata de grados de ploidía impares. Sin embargo, cuando los grados de ploidía son pares es posible una solución mediante la formación preferente de bivalentes, rasgo adaptativo observado en la estabilización de algunos poliploides (Weiss y Maluszynska, 2000; Santos et al., 2003).

En alopoliploides, la diploidización citológica supone la restricción de los sobrecruzamientos a cromosomas exclusivamente homólogos (Cifuentes et al., 2010). Para que esto suceda, el apareamiento entre cromosomas de distinto genoma (cromosomas homeólogos) debe ser suprimido y esto se logra a través de mecanismos regulados genéticamente (Comai, 2005). Por ejemplo, en trigo alohexaploide, un gen llamado *Ph1* (de "*Pairing homeologous*") que suprime el

apareamiento homeólogo, pudo surgir después de originarse el poliploide, primitivo como una adaptación que conduce a la diploidización (Sears, 1976).

## 5. Estructura cromosómica del trigo

La aloploidia hace posible la convergencia en un solo organismo de genomas previamente adaptados a diferentes ambientes. Así se crearía un mayor potencial para la adaptación de las especies aloploides, hacia una gama más amplia de condiciones ambientales (Dubkovsky y Dvorak, 2007). Existen tres niveles ploídicos en la familia Triticeae a la que pertenecen los trigos cultivados; especies diploides ( $2n=2x=14$ ) especies tetraploides ( $2n=4x=28$ ) y especies hexaploides ( $2n=6x=42$ ) (Kihara, 1919; 1924). Las especies diploides surgieron en un proceso de diferenciación divergente a partir de una especie ancestral con  $2n=14$  cromosomas (Mason-Gamer y Kellogg, 1996). Los poliploides surgieron por hibridación entre diploides. Entre los diploides se encuentran las especies *Triticum monococcum* y *T. urartu* que comparten un genoma muy similar denominado genoma A. Entre los trigos tetraploides se encuentra la especie *T. turgidum* (AABB) que se originó mediante hibridación entre *T. urartu* y *Aegilops speltoides*, especie que aportó el genoma B, y duplicación cromosómica posterior. Dentro de esta especie se encuentra la variedad cultivada denominada trigo duro que se utiliza para fabricar la pasta. El trigo hexaploide está representado por la especie *T. aestivum* (AABBDD) producida por hibridación entre *T. turgidum* y *Aegilops tauschii*, que aportó el genoma D, y posterior duplicación cromosómica del híbrido. Esta es una especie cultivada utilizada para fabricar la harina del pan (Revisión de Maestra y Naranjo, 2000).

## 6. Identificación y efecto del locus *Ph1*

Fueron Riley y colaboradores (1959) quienes comprobaron que el control genético que suprime el apareamiento entre cromosomas homeólogos en trigo, descubierto años antes (Okamoto, 1957; Sears y Okamoto, 1958; Riley y Chapman, 1958), efectivamente residía en el cromosoma 5B. Posteriormente, el brazo largo del cromosoma 5B fue señalado como la zona donde ocurre dicho efecto supresor (Riley 1960; Riley y Chapman 1964). Más específicamente, el locus *Ph1*, esta localizado a una distancia aproximada de 1.0 centimorgan del centrómero (Sears,



1984) en la mitad del brazo 5BL (Jampates y Dvorak, 1986). El locus *Ph1* está en el cromosoma 5B tanto del trigo hexaploide (AABBDD) como del tetraploide (AABB). En ambos se encuentra incluido en dos delecciones solapadas, *ph1b* y *ph1c*, respectivamente (Sears, 1977; Giorgi, 1978). El orden de los genes en los cromosomas 5A, 5D y en otros cromosomas de trigos poliploides de especies relacionadas, es muy similar al del 5B. Sin embargo, la actividad de *Ph1* es única para 5B. Griffiths et al (2006) han localizado el gen *Ph1* en una región intersticial del cromosoma 5B de trigo que contiene 2.5-megabase. Esta región contiene un segmento de heterocromatina subtelomérica, insertado entre un grupo de genes repetidos relacionados con *cdc2*, un gen del ciclo celular que codifica para una quinasa dependiente de ciclina. La presencia de esta estructura en especies poliploides de trigo emparentadas, pero no en sus progenitores diploides, hace pensar que dicha estructura sea un buen candidato para el locus *Ph1*.

Los cromosomas homeólogos pueden aparear y recombinar cuando existe nulisomía para el cromosoma 5B o por la presencia de la mutación "*ph1b*" del gen *Ph1* (Sears, 1977). Este apareamiento homeólogo puede producirse tanto en plantas de trigo como en híbridos interespecíficos. En éstos últimos puede haber también apareamiento homeólogo entre los cromosomas de trigo y de la otra especie (Naranjo y Fernández-Rueda, 1996). En trigo con genotipo normal, la sinapsis puede ocurrir entre cromosomas homólogos o entre cromosomas homólogos y homeólogos. Como resultado de esto último se forman multivalentes, que en el curso de la profase I son transformados en bivalentes (Holm, 1986). En plantas carentes del gen *Ph1*, muchas de esas asociaciones multivalentes permanecen hasta metafase I. Esto se debe a que en ausencia del gen *Ph1* no se produce la correcta distinción entre homólogos y homeólogos. De esta forma, no hay corrección del apareamiento homeólogo, permitiéndose la formación de quiasmas entre ellos (Holm y Wang, 1988).

Martínez et al., (2001a), en un estudio con distintas dosis (0, 2 y 4) de *Ph1* en trigo tetraploide, encontraron que los mutantes con cuatro dosis tenían un mayor número de bivalentes en cigotena media que los otros dos tipos de plantas. Observaron también una reducción progresiva en la frecuencia de multivalentes a lo largo de cigotena y paquitena. En ausencia del gen *Ph1* un número considerable de multivalentes persisten en paquitena y llegan a metafase I. Estos resultados

sugieren una acción del locus *Ph1* sobre el mecanismo de corrección de la sinapsis, que transforma multivalentes en bivalentes, lo cual implica un proceso de comprobación de la homología. La recombinación producida por inducción genética de apareamiento homeólogo, se ha usado a menudo para transferir material genético de interés de otras especies a los cromosomas de trigo (Gale y Miller, 1987; Islam y Shepherd, 1991).

Además de *Ph1*, se conocen otros genes supresores del apareamiento homeólogo. Uno de ellos es el gen *Ph2* ubicado en el brazo corto del cromosoma 3 del genoma D (3DS) (Mello-Sampayo, 1971; Mello-Sampayo y Lorente, 1968; Upadhy y Swaminathan, 1967). Otro gen supresor, está ubicado en el brazo corto del cromosoma 3 del genoma A (3AS). Este tiene un menor efecto supresor que *Ph1* (Driscoll, 1972; Mello-Sampayo y Canas, 1973). La evidencia que aportan híbridos de trigo con centeno, indica que la deficiencia de ambos genes, 3AS y 3DS (*Ph2*) resulta en un nivel de apareamiento homeólogo casi tan alto como el máximo previsto en plantas nulisómicas para 5BL (*Ph1*) (Mello-Sampayo y Canas, 1973).

## **7. Tolerancia a la manipulación cromosómica en trigo**

La constitución cromosómica del trigo hexaploide le proporciona una serie de ventajas genéticas que están ausentes en trigo tetraploide y, por supuesto, en las especies diploides. La presencia de tres genomas relacionados hace posible que puedan ser viables los individuos nulisómicos. La pérdida de un par de homólogos la compensan, al menos en parte, los otros dos pares homeólogos existentes. Esta propiedad hizo posible el desarrollo de líneas nulitetrasómicas a partir de las cuales se establecieron los siete grupos de homología del trigo (Sears, 1966). Igualmente, pudo desarrollarse la serie monosómica. A partir de estas líneas, fue posible aislar también líneas ditelocéntricas estables que han perdido un brazo cromosómico.

El trigo hexaploide puede cruzarse con otras especies de la tribu Triticeae. A partir de los híbridos, pueden obtenerse aloploides sintéticos y mediante cruzamientos sucesivos con trigo pueden reducirse los cromosomas de la otra especie a uno solo, que por autofecundación puede obtenerse en condición disómica. Así se han obtenido líneas de adición de cromosomas de centeno en trigo (Driscoll y Sears, 1971). Utilizando una metodología similar se han obtenido

también líneas de sustitución, en las que un cromosoma de trigo es sustituido por el homeólogo de la especie afín.

A partir de líneas de adición o de sustitución, han surgido líneas de trigo con traslocaciones Robertsonianas que contienen cromosomas con un brazo de trigo y otro de otra especie. Tales líneas se producen por misdivisión de los centrómeros en meiosis y la posterior fusión de brazos de especies distintas (Friebe et al., 2005). Las traslocaciones Robertsonianas trigo-centeno han sido utilizadas para derivar traslocaciones trigo-centeno de segmentos más cortos. Esto se ha hecho mediante recombinación homeóloga, inducida con mutantes del locus *Ph1* (Lukaszewski et al., 2005). Todas estas líneas tienen una gran aplicación en programas de mejora y en el estudio del comportamiento cromosómico.

## **8. Disposición de los cromosomas homólogos en células somáticas y premeióticas**

En células en interfase los cromosomas de muchas especies, sobre todo las que tienen genomas grandes como es el trigo hexaploide (Abranches et al., 1998; Dong y Jiang, 1998), están organizados según la “configuración Rabl”. Esta configuración consiste en una disposición bipolar de centrómeros y telómeros, en la cual los centrómeros se encuentran agrupados en un polo del núcleo y los telómeros en el hemisferio contrario. Es por tanto, producto de la disposición cromosómica durante la segregación anafásica previa. Además de esta disposición, durante mucho tiempo, se ha estado considerando que la posición de los cromosomas en interfase estuviera relacionada con su función genética. Por esta razón, se consideraba que los cromosomas homólogos debieran encontrarse muy próximos, es decir, que presentaran asociación somática. Esta disposición se encuentra en organismos como *Drosophila* y otros dípteros. Y desde hace casi un siglo, se sabe que existen tanto en células somáticas como en células de la línea germinal (Metz, 1916). Existe evidencia de que dichas asociaciones comienzan en el centrómero y, a continuación, progresan por el brazo cromosómico (Loidl et al., 1994; Lake y Hawley, 2012). En otras especies no se han encontrado evidencias palpables de asociación somática (Naranjo y Corredor, 2008).

Los primeros estudios sobre meiosis indicaban que los homólogos no están apareados en leptotena, pero sí lo están en paquitena (Rhoades, 1961). A pesar de

ello, se sugirió la existencia de un alineamiento premeiótico de los homólogos en interfase premeiótica, como paso previo a su apareamiento meiótico (Brown y Stack, 1968; Comings, 1968). Feldman (1966) propuso que, los homólogos están asociados en interfase premeiótica en trigo, y que esta es la causa de que se formen solo bivalentes en metafase I. El locus *Ph1* determinaría esta disposición, impidiendo la aproximación de los homeólogos.

La posición de los cromosomas en interfase premeiótica ha podido ser visualizada mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH de “*Fluorescence in situ hybridization*”) en líneas de adición, sustitución y traslocación obtenidos entre trigo y especies afines o entre avena y maíz. Aragón-Alcaide et al., (1997) propusieron la existencia de asociación premeiótica de homólogos en líneas de sustitución trigo-cebada. Las interacciones homólogas se iniciarían en el centrómero y se extenderían por el resto del cromosoma. Una conclusión similar obtuvo Schwarzacher (1997) en una línea con una traslocación Robertsoniana trigo-centeno (5AS.5RL). El comportamiento de dos cromosomas homólogos de maíz añadidos a avena se contrapone con lo indicado anteriormente. En núcleos en interfase premeiótica de estas líneas de adición, los cromosomas de maíz se encuentran organizados en pequeños dominios. Dichos dominios ocupan territorios nucleares separados en la mayoría de las células (Bass et al., 2000). Las observaciones en cigotena apoyaban que el apareamiento y la sinapsis de los cromosomas homólogos, son procesos que, en gran medida, coinciden descartándose así la ocurrencia de apareamiento previo a la meiosis, como mecanismo de selección de la pareja homóloga. Es decir, que pese a que los cromosomas están condensados y separados dentro del núcleo premeiótico, pueden encontrarse el uno al otro durante la profase meiótica. Un estudio en una línea de adición disómica trigo-centeno (5RL), demostró que en interfase premeiótica los dos telosomas de centeno aparecen como delgados hilos fluorescentes. Estos se encuentran a menudo difuminados y con un número variable de discontinuidades (Maestra et al., 2002). También, en este caso, los cromosomas de centeno se situaban en territorios completamente separados en la mayoría de los núcleos. En el resto, se podían encontrar en territorios parcial o completamente superpuestos. Esta disposición en interfase previa a la meiosis, no se veía afectada por la presencia o ausencia del gen *Ph1*. La posición relativa de los

cromosomas homólogos en núcleos premeióticos de líneas de adición trigo-centeno y avena-maíz, demuestra que, en las plantas, los homólogos se encuentran separados en el inicio de la meiosis. De hecho, los cromosomas de centeno añadidos al trigo, permanecen separados en leptotena temprana (Maestra et al., 2002). La disposición premeiótica del cromosoma es modificada en las primeras etapas de la meiosis por la formación del bouquet, la descondensación de la cromatina y el inicio y desarrollo de la sinapsis (Maestra et al., 2002).

## **9. Dinámica de los centrómeros en el comienzo de la meiosis**

Al estar presentes en todos los cromosomas, los centrómeros y telómeros, representan puntos de inicio apropiados para las interacciones en la búsqueda de homología (Naranjo y Corredor, 2008). Los centrómeros se asocian en diversos organismos durante leptotena (Church and Moens, 1976; Bennett, 1979; Bennett et al., 1979; Del Fosse y Church, 1981; Martínez-Pérez et al., 1999, 2000; Prieto et al., 2004a; Haizel et al., 2005; Tsubouchi y Roeder, 2005). Y también en esta fase los telómeros se agrupan formando el bouquet en la mayoría de las especies (Bass et al., 2000; Niwa et al., 2000; Trelles-Sticken et al., 2000; Cowan et al., 2001; Scherthan, 2001; Harper et al., 2004). Ambas estructuras cromosómicas pueden estar implicadas en interacciones entre homólogos y por eso se ha sugerido que están involucradas en los mecanismos responsables de la elección correcta de pareja. Un mecanismo de búsqueda de homología que comenzara en centrómeros o en telómeros, evitaría la inspección del genoma completo y facilitaría el reconocimiento de los homólogos.

La presencia de asociaciones centroméricas en interfase premeiótica se detectó inicialmente mediante microscopía electrónica en *Allium fistulosum* (Church y Moens, 1976) y en *Lilium* (Church, 1981; Del Fosse y Church, 1981), sugiriendo que tales asociaciones no se daban entre cromosomas homólogos. Sin embargo, la asociación de centrómeros homólogos en interfase premeiótica en *Ornithogalum virens* parecía ser frecuente (Church, 1981). Las observaciones realizadas en centeno, trigo y triticale por Bennett et al., (1979), les llevaron a la conclusión de que podría existir un alto grado de asociación homóloga en las asociaciones centroméricas de interfase premeiótica. Los análisis con FISH indicaron que los centrómeros de los cromosomas de trigo están asociados, en

promedio, en pares durante la interfase premeiótica y de aquí se sugirió que serían homólogos (Aragón-Alcaide et al., 1997; Martínez-Perez et al., 1999; 2001; Maestra et al., 2002). No obstante, estas asociaciones son preferentemente no homólogas como demostraron Maestra y colaboradores (2002).

En trigo, durante leptotena, se produce una reducción en el número de señales centroméricas por la formación de complejos multicentroméricos. Esto permite la observación de siete grupos difusos que permanecen en la periferia del núcleo en el polo opuesto a los telómeros. Dichas observaciones sugieren que esta asociación no es al azar y que afecta a los cromosomas que pertenecen a cada uno de los siete grupos de cromosomas homeólogos (Martínez-Perez et al., 2003). Martínez-Perez et al (2003), proponen que esta disposición de los centrómeros en el inicio de la meiosis, proporciona un mecanismo para clasificar a los cromosomas, que opera antes de que los telómeros estén asociados en el bouquet. Esta hipótesis ha sido estudiada en líneas de adición trigo-centeno y en líneas de trigo con introgresiones de centrómeros de centeno (Corredor y Naranjo, 2007; Corredor et al., 2007). En los estados presinápticos de todas las líneas estudiadas, es decir, en interfase premeiótica y leptotena temprana, la frecuencia de asociación de centrómeros homólogos fue relativamente baja. Así mismo, la presencia o ausencia del locus *Ph1* no afectó al tipo de centrómeros que participan en las interacciones. La frecuencia de asociación de los centrómeros homólogos se incrementó en cigotena y paquitena como resultado de la progresión de la sinapsis. Dicho aumento se produjo más temprano entre los cromosomas telocéntricos, que entre los cromosomas con dos brazos. La asociación más rápida de los centrómeros de los cromosomas telocéntricos, en relación con los centrómeros de los cromosomas con ambos brazos, fue causada por la migración de los primeros al polo telomérico, arrastrados por el telómero adyacente. Dichas observaciones apoyan la conclusión de que, en el trigo, la agrupación de los centrómeros en meiosis temprana no se basa en homología y, por tanto, no puede promover el reconocimiento entre cromosomas homólogos. Este papel recae principalmente en las regiones subteloméricas.

Corredor y colaboradores (2007) sugieren que el conglomerado de centrómeros producido en leptotena, participa en el mantenimiento de la organización bipolar del núcleo, mientras que, los telómeros están convergiendo

en una pequeña región de la envoltura nuclear, para formar el bouquet. Martínez-Pérez et al., (2000) sugieren que las asociaciones entre centrómeros que ocurren antes de meiosis, son inducidas por la condición poliploide, pues aparece en distintos poliploides, pero no en las especies diploides emparentadas con ellos. Sin embargo, se han encontrado asociaciones entre los centrómeros en células premeióticas de especies diploides como centeno (Bennett et al., 1979), arroz (Prieto et al., 2004a) o *Luzula* (Haizel et al., 2005) y podrían contribuir a mantener la estabilidad nuclear tanto en diploides como en poliploides.

## **10. Dinámica de los telómeros en el comienzo de la meiosis, formación del bouquet**

El bouquet telomérico es una organización cromosómica exclusiva de meiosis (Harper et al., 2004; Zickler y Kleckner, 1999). En profase I, los telómeros se agrupan en un lugar junto a la envoltura nuclear (NE de “Nuclear envelope”) adquiriendo el conjunto de cromosomas el aspecto de bouquet o ramillete de flores. La coincidencia temporal del estado de bouquet con el apareamiento entre cromosomas homólogos, el inicio de la recombinación y de la sinapsis sugieren un papel de esta estructura en estos procesos (Ronceret et al., 2008). El bouquet se forma en la mayoría de los organismos estudiados, sin que importe el tamaño de su genoma. Ejemplos de organismos con genoma pequeño son las levaduras, *S. pombe* o *S. cerevisiae* (Dernburg et al., 1995; Scherthan, 2001). Como organismos que no desarrollan bouquet cabe citar al nemátodo *C. elegans* o a *Drosophila*, que emplean otros mecanismos de búsqueda de homología (McKee, 2004). La formación del bouquet ha sido estudiada en varias especies de plantas, principalmente en gramíneas como centeno, trigo o maíz mediante la aplicación de técnicas de FISH (Bass et al., 2000; Cowan y Cande, 2002; Martínez-Pérez et al. 1999, Noguchi, 2002). Una excepción entre plantas la constituye *Arabidopsis* (Ronceret et al., 2008; Bozza y Pawlowski, 2008), ya que no forma un bouquet telomérico típico. Fueron Armstrong y colaboradores (2001), quienes observaron que en esta especie los telómeros se agrupan alrededor del nucléolo en interfase premeiótica. Esta agrupación podría jugar un papel equivalente al del bouquet.

En la mayoría de los organismos, el bouquet se consolida en la transición de leptotena a cigotena y se desorganiza al final de cigotena (Harper et al., 2004). La

formación del bouquet se desarrolla en dos etapas distintas. En primer lugar, en leptotena temprana, los telómeros se unen a la envoltura nuclear y forman un número variable de agrupaciones. Después se produce la convergencia de todos ellos en un único grupo situado junto a la membrana nuclear (Bass et al., 2000; Cowan y Cande, 2002). Esta migración convergente está dirigida por elementos del citoesqueleto y puede interrumpirse con agentes como la colchicina que destruye los microtúbulos (Corredor y Naranjo, 2007). La unión de los telómeros de los cromosomas a la envoltura nuclear se lleva a cabo mediante pares de proteínas que se sitúan una hacia la cara interna, para ponerse en contacto con la cromatina, y otra hacia la cara externa, para ponerse en contacto con los elementos citoplasmáticos del citoesqueleto. Estas proteínas que conectan telómeros y citoesqueleto han sido identificadas en organismos como *S. pombe* o *C. elegans*. La situada en la cara interna del núcleo tiene un dominio SUN y la situada en la cara externa otro dominio característico denominado KASH. En otros organismos solo se ha identificado uno de los componentes de este sistema de anclaje (Revisado por Bhalla y Dernburg, 2008). En el caso de *S. pombe* son los microtúbulos citoplasmáticos procedentes del cuerpo polar del huso los que conectan con los telómeros a través del complejo proteico SUN-KASH. Esta conexión está mediada por dineína, una proteína motora que se asocia a los microtúbulos (Yamamoto y Yasushi, 2001). En *S. cerevisiae* la conexión de los telómeros con el citoesqueleto no implica a los microtúbulos sino a filamentos de actina (Trelles-Sticken et al., 2005).

La agrupación de los telómeros causa el confinamiento de las regiones subteloméricas de los cromosomas en un volumen pequeño del núcleo facilitando así la búsqueda de homología entre el conjunto de cromosomas agrupados (Scherthan, 2001). En la formación del bouquet juegan un papel importante las secuencias teloméricas (Harper et al., 2004). Así lo demuestran los cromosomas telocéntricos de maíz y centeno producidos después de una misdivisión centromérica seguida de una adición de novo de telómero, en la zona de rotura del centrómero. El efecto del telómero añadido permite al centrómero de esos cromosomas entrar al bouquet, mientras que el centrómero original del cromosoma con ambos brazos permanece en el polo centromérico (Carlton y Cande, 2002; Maestra et al., 2002; Corredor y Naranjo, 2007; Corredor et al., 2007). La misma conclusión se deriva de cromosomas circulares con secuencias



teloméricas interiores que también pueden entrar al bouquet (Carlton y Cande, 2002).

### **11. Mutantes que afectan a la formación del bouquet**

Los mutantes que no forman bouquet exhiben defectos en el apareamiento cromosómico, sinapsis y recombinación. Esto implica que la formación del bouquet facilita la ocurrencia de esos procesos meióticos (Niwa et al. 2000; Trelles-Sticken et al., 2000; Golubovskaya et al. 2002; Harper et al. 2004). Dichos mutantes pueden tener afectadas las proteínas que participan en la conformación de la estructura del telómero, como Taz1, o en la unión de este a la membrana nuclear, como Ndj1. La ausencia de la proteína telomérica *Taz1* o la telomerasa de ratones, conduce a similares defectos en la formación del bouquet, apareamiento y recombinación (Cooper et al., 1998; Liu et al., 2004). En ausencia de la proteína Ndj1, no se produce la unión de telómeros a la NE, inhibiéndose la formación del bouquet en *S. cerevisiae* (Trelles-Sticken et al., 2000; Joseph et al., 2005).

Un estudio cuantitativo de la formación del bouquet, en meiocitos de centeno, procedentes de cultivos de anteras, indicó la formación de minigrupos de telómeros intermediarios que preceden a la convergencia de todos ellos en uno de los polos del núcleo (Carlton et al., 2003). Estos agregados teloméricos intermediarios son evidentes en meiocitos de mutantes como *pam1* (*plural abnormalities of meiosis 1*) de maíz y *sy1* de centeno. Ambos forman un bouquet aberrante, que no logra completarse (Golubovskaya et al., 2002; Mikhailova et al., 2001). Este comportamiento demuestra que la agregación inicial de telómeros en grupos y la migración telomérica son dos etapas distintas de la formación del bouquet (Corredor y Naranjo, 2007).

### **12. Reconocimiento de los homólogos: Mecanismo dependiente de recombinación**

El reconocimiento de los homólogos dependiente de la recombinación se corresponde con el mecanismo de reparación de las DSBs producidas por SPO11, a través de la invasión de dobles moléculas de DNA del cromosoma homólogo por las cadenas sencillas surgidas en el procesamiento de las DSBs. Esta invasión y su estabilización temporal durante el proceso de reparación se produce tras el

reconocimiento de una secuencia complementaria en la molécula invadida. La búsqueda de homología está dirigida por las recombinasas Rad51 y Dmc1, proteínas que se unen a las cadenas sencillas invasoras formadas en el extremo 3' de las DSBs. Las evidencias experimentales en ratón, maíz y otros organismos, basados en análisis de mutantes defectivos de *rad51* y *dmc1* y en análisis de los cambios en la distribución de Rad51 en meiosis, confirman que Dmc1 desempeña una función esencial y específica durante el proceso de recombinación entre cromosomas homólogos en meiosis. Esta proteína podría estar implicada en dirigir a Rad51 para favorecer la recombinación entre homólogos, frente a la recombinación entre cromátidas (Eggler et al., 2002; Sung et al., 2003).

### **13. Reconocimiento de los homólogos: Mecanismo independiente de recombinación; Centros de apareamiento (PCs de “Pairing center”)**

Los PCs son sitios que promueven el apareamiento homólogo en ausencia de DSBs. Estos PCs han sido estudiados en *C. elegans* y *D. melanogaster*.

En *C. elegans* los PCs son regiones específicas de la secuencia de ADN que actúan en *cis*, llamadas también regiones de reconocimiento homólogo. Estas regiones han sido identificadas en un extremo de cada uno de los 6 cromosomas. Existen cuatro proteínas, que se asocian a estas zonas de reconocimiento homólogo y son requeridas para su correcto funcionamiento: ZIM-1, ZIM-2, ZIM-3 y HIM-8 (Phillips et al., 2009). La proteína HIM-8 se une de manera específica al PC del cromosoma X y ZIM-2 se une al PC del cromosoma V. Mientras que las otras dos proteínas se unen a los PCs de dos cromosomas diferentes; ZIM-1 a los PCs de los cromosomas II y III y ZIM-3 a los PCs de los cromosomas I y IV (Revisado en Tsai y McKee, 2011). Diversos estudios en *C. elegans* con traslocaciones o deleciones que implican a los PCs han mostrado un efecto severo de estas alteraciones cromosómicas sobre el intercambio genético y segregación (McKim et al., 1988; Zetka y Rose, 1992; Villeneuve, 1994; MacQueen et al., 2005). Esto indica que los PCs son necesarios para estabilizar el apareamiento homólogo y promover la formación del complejo sinaptonémico y la recombinación entre cromosomas homólogos (MacQueen et al., 2002; MacQueen, et al., 2005).

Los estudios realizados en *Drosophila melanogaster* han sido en los cromosomas sexuales X e Y de machos. Estos cromosomas al no ser homólogos,

aparean a través de un sitio en el que comparten homología. Este corresponde a la región de rDNA (que contiene los genes que codifican para RNA ribosómico 18S, 5.8S) y que está presente en ambos cromosomas. Es en esta región donde se produce el apareamiento (Gerton y Hawley, 2005; Tsai y McKee, 2011). Los genes de rRNA contienen un número de repeticiones entre 200 y 250 dispuestas en tandem en la región central de la heterocromatina del cromosoma X y próximos a la base del brazo corto del cromosoma Y. Se ha observado que en machos que tienen una delección en la heterocromatina proximal del cromosoma X, incluyendo los genes de rRNA, se produce un fallo del apareamiento entre los cromosomas X e Y, y en su segregación (McKee, 1996).

#### **14. Puntos calientes para la recombinación**

Los eventos de recombinación meiótica no están distribuidos aleatoriamente en el genoma, sino que, ocurren con una frecuencia relativamente alta en regiones específicas llamadas puntos calientes de recombinación (Roeder, 1997; Cnudde y Gerats, 2005). Los puntos calientes de recombinación se corresponden con sitios de la cromatina que son hipersensibles a la acción de nucleasas. Cuando las células vegetativas entran en meiosis, estas regiones experimentan modificaciones que incrementan su sensibilidad a la digestión de las nucleasas (Ohta et al., 1994; Wu y Lichten, 1994; Fan y Petes, 1996).

Solo en *S. cerevisiae* (Pan et al., 2011) y en ratón (Smagulova, 2011) se han construido mapas de alta resolución de los sitios donde ocurren las DSBs meióticas. En ambas especies se aprecia una correlación entre la visualización de los mapas de sobrecruzamientos y el mapa de DSBs. En *S. cerevisiae* las DSBs ocurren preferentemente en regiones intergénicas adyacentes a los promotores de transcripción (Gerton et al., 2000). Aunque la transcripción no es requerida para la inducción de DSBs (Roeder, 1997). En ratón los puntos calientes tienden a solapar con genes aunque también pueden hacerlo con secuencias intergénicas entre las que se encuentran elementos repetidos. Los puntos calientes comparten secuencias consenso caracterizadas por una distribución desigual de nucleótidos. En la dirección de 5' a 3' la mitad comprendida entre el extremo 5' y el centro de la secuencia es rica en purinas y la otra mitad rica en pirimidinas. Esta organización se observa también en zonas donde comienza la replicación o la transcripción.

Además estas secuencias son susceptibles a ser ocupadas por nucleosomas (Smagulova et al., 2011). En *S. pombe*, las DSBs aparecen agrupados en largas regiones intergénicas no necesariamente asociadas a promotores de transcripción (Cromie et al., 2007). La distribución de las DSBs en numerosos organismos en los que no han sido directamente cartografiadas, se ha inferido a partir de CO. Los niveles de recombinación varían entre especies, entre cromosomas dentro de las especies y entre regiones dentro de los cromosomas (Jensen-Seaman et al., 2004). Los seres humanos tienen dos veces más recombinación que el ratón y la rata. La tasa de recombinación en seres humanos es elevada cerca de los telómeros y reducida en las proximidades de los centrómeros, mientras que en el ratón y la rata, la proximidad a los telómeros tiene menos efecto en el nivel de recombinación (Jensen-Seaman et al., 2004). En el caso de las plantas toda información sobre distribución de DSBs procede de observaciones sobre distribución de quiasmas o de nódulos de recombinación (Mézard et al., 2007).

## **15. Localización de quiasmas en plantas**

El tamaño de los cromosomas y su morfología varía entre diferentes especies de plantas, y también varía la distribución de los sobrecruzamientos. En plantas con genomas pequeños, como arroz, *Arabidopsis* o tomate, los sobrecruzamientos están distribuidos a lo largo de los brazos cromosómicos con una considerable reducción en regiones proximales (Stephan y Langley, 1998; Wu et al., 2003; Kao et al., 2006; Mézard, 2006). La recombinación tiende a disminuir también justo al lado de los telómeros en tomate. Entre especies con genomas grandes, *Allium fistulosum* muestra una ubicación proximal de los sobrecruzamientos (Jones, 1984). La frecuencia de quiasmas suele aumentar con la distancia al centrómero en muchas otras especies, tales como, maíz, trigo o cebada (Lukaszewski y Curtis, 1993; Akhunov et al., 2003; Anderson et al., 2004; Kunzel et al., 2000). El centeno (*Secale cereale*) es un ejemplo representativo de especies con quiasmas distales que ha sido usado en numerosos estudios citológicos sobre frecuencia y distribución de quiasmas (Lukaszewski, 2008). Muchas otras especies dentro de la familia Poaceae, muestran un patrón de distribución de quiasmas similar al de centeno. Casi todos los sobrecruzamientos detectados en la construcción de mapas genéticos de centeno, trigo y cebada se concentran en la

mitad distal de los brazos cromosómicos (Curtis y Lukaszewski, 1991; Gill et al., 1996a,b; Künzel et al., 2000; Lukaszewski 1992; Lukaszewski y Curtis, 1993; Saintenac et al., 2009). Los análisis ultraestructurales de la formación de los SCs en numerosas especies de plantas, han demostrado que el comienzo del apareamiento se produce en sitios distales y seguidamente en numerosas regiones intercalares. Esto sucede independientemente de cuál sea la distribución de los quiasmas (Gillies, 1975, 1985; Holm, 1977, 1986; Albini y Jones, 1987; Martínez et al., 2001a,b; López et al., 2008).

Los datos de distribución de quiasmas en plantas han sido obtenidos a partir de la construcción de mapas génicos y a través de la observación citológica de esos quiasmas. Dichos análisis citológicos se han enfocado a la identificación directa de los quiasmas o a la de un tipo de nódulo de recombinación, los nódulos de recombinación tardíos, que a continuación se definirán.

Los nódulos de recombinación (RNs de “Recombination nodules”) son complejos proteicos redondeados y elipsoides, con un diámetro entre 50 y 250 nm. Se observan asociados a ambos elementos axiales y a los SCs desde leptotena a paquitena. Existen dos tipos de RNs: Los nódulos de recombinación tempranos (ENs de “Early nodules”) y nódulos de recombinación tardíos (LNs de “Late nodules”). Se han observado proteínas involucradas en la recombinación en ambos tipos de nódulos. Los ENs y los LNs se diferencian en tamaño, forma, número, características de tinción y proteínas que los componen (Anderson y Stack, 2005). Los ENs son 20 veces más numerosos que LNs, están asociados con los elementos laterales y con los SCs, en estados tempranos de la profase I, desde leptotena a paquitena temprana, momento en el que abandonan bruscamente el SC, quedando solo unos pocos hacia paquitena tardía (Anderson y Stack, 2005). Los ENs se producen a lo largo de toda la eucromatina. Han sido muy pocos los que se han visto en regiones centroméricas/heterocromáticas (Zickler y Kleckner, 1999). Los ENs han sido completamente estudiados en tomate, cebolla y maíz. Sus patrones característicos parecen ser similares en otros organismos. Su función aun no está clara, pero al localizarse en los puntos donde los elementos axiales convergen antes de la sinapsis, se piensa que están implicados en la búsqueda de homología en el DNA y en la formación del SC (Stack y Anderson, 2002). Asimismo, por contener enzimas de recombinación tales como, Rad51 y Dmc1, se les supone

también un papel en la recombinación, ya sea relacionado con la conversión génica o con el sobrecruzamiento (Stack y Anderson, 2002; Anderson y Stack, 2005).

Los LNs son menos numerosos que los ENs y se piensa que podrían formarse a partir de algunos ENs. Los LNs se encuentran asociados al SC desde paquitena a diplotena (Anderson y Stack, 2005). En paquitena se encuentran asociados al SC en los puntos donde ocurren los sobrecruzamientos, específicamente en los sitios donde más tarde aparecerán los quiasmas. De hecho, probablemente representan fábricas moleculares donde se lleva a cabo la formación de sobrecruzamientos. Esto se deduce del hecho de que los LNs contienen enzimas de recombinación tales como, Mlh1 y Msh4, que intervienen en la formación de sobrecruzamientos (Anderson y Stack, 2005).

Los estudios llevados a cabo en centeno, maíz, y tomate muestran que los LNs distales se correlacionan con la posición distal de los quiasmas. Del mismo modo, cuando los quiasmas son proximales como en puerro, *Allium porrum*, los LNs se encuentran ubicados cerca de los centrómeros (revisado en Zickler y Kleckner, 1999).

## **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

El objetivo principal que nos planteamos para desarrollar esta investigación fue profundizar en las causas del apareamiento, sinapsis y recombinación entre cromosomas homólogos de centeno y de trigo, cuyo inicio se sabe que ocurre en zonas distales. Concretamente pretendíamos averiguar si el reconocimiento entre homólogos se puede atribuir o no a secuencias específicas de DNA localizadas en posiciones distales de los cromosomas y tratamos de delimitar con la mayor precisión posible la ubicación de esas secuencias.

Para estudiar el papel de las regiones cromosómicas distales en el reconocimiento homólogo hemos utilizado diversos tipos de reordenaciones cromosómicas que aparecen indicadas a continuación.

1. Hemos estudiado el efecto de la mitad distal y de la mitad proximal del brazo largo del cromosoma 5R de centeno en el reconocimiento de los homólogos en plantas homocigóticas y heterocigóticas para una delección que cubre el 70% distal de dicho brazo.
2. También hemos analizado el efecto derivado del cambio de conformación experimentado por el cromosoma 5R como consecuencia de esa delección sobre el reconocimiento de los homólogos.
3. El papel que desempeñan las regiones distales y proximales del brazo largo del cromosoma 1RL de centeno, lo hemos estudiado utilizando una inversión que abarca al 95% de dicho brazo. El estudio lo desarrollamos en líneas homocigóticas y heterocigóticas para la inversión, así como en plantas normales. Hemos considerado dos situaciones: una en la que el brazo 1RL es realmente un cromosoma telocéntrico, y otra, cuando dicho brazo forma parte de un cromosoma 1R normal con dos brazos.
4. Hemos analizado también el papel que desempeñan distintas porciones distales de los brazos 1RS y 2RL de centeno en líneas con traslocaciones trigo-centeno que afectan a dichos brazos. Hemos analizado las traslocaciones de tal manera que el segmento terminal del par cromosómico en estudio contenga homología, ya sea centeno-centeno o trigo-trigo, mientras que el resto del brazo no, es decir, material genético de trigo en un cromosoma y centeno en el otro. Hemos invertido también la



construcción del par, es decir, homología proximal, pero no terminal. Las traslocaciones empleadas han sido varias en cada caso, 1RS o 2RL, cambiando entre ellas la longitud del segmento escrutado.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Material

El material utilizado está compuesto por diversas líneas de trigo hexaploide, *Triticum aestivum*,  $2n=6x=42$  (fórmula genómica AABBDD), que llevan incorporados parejas de cromosomas homólogos de centeno como el cromosoma 5R o el 1R, o derivados de ellos, o segmentos cromosómicos determinados del brazo corto del cromosoma 1R (1RS) o del brazo largo del cromosoma 2R (2RL). Las líneas del primer tipo que incorporaban cromosomas de centeno eran líneas de adición o líneas de sustitución, mientras que las del segundo tipo eran líneas de translocación que contenían un segmento de centeno del brazo 1RS en el brazo 1BS de trigo o un segmento del brazo 2RL en el brazo 2BL de trigo. Estas líneas fueron empleadas para estudiar el comportamiento meiótico del par cromosómico 5R, el comportamiento meiótico del brazo largo del cromosoma 1R (1RL), y el comportamiento meiótico de los brazos 1RS y 2RL de centeno y sus homeólogos de trigo 1BS y 2BL. Para describir en detalle cada una de las plantas utilizadas haremos referencias a los cromosomas o brazos cromosómicos estudiados.

#### 1.1.- Plantas empleadas en el análisis del cromosoma 5R

Se han utilizado tres tipos de plantas:

La línea disómica de adición Chinese Spring-5R ( $2n=44$ ) que lleva el cromosoma 5R del cultivar Imperial de centeno incorporado al cultivar Chinese Spring de trigo.

La línea disómica Chinese Spring-5Rdel ( $2n=44$ ) que fue aislada de la anterior y es homocigótica para una delección que cubre el 70% terminal del brazo largo. Esta línea se obtuvo por autofecundación de un heterocigoto 5R/5Rdel surgido espontáneamente y detectado en un control rutinario.

Plantas heterocigóticas para la delección ( $2n=44$ ) 5R/5Rdel obtenidas en el cruzamiento entre los dos tipos de homocigotos.

## **1.2.- Plantas utilizadas en el análisis del brazo 1RL**

En este análisis se utilizaron seis tipos de plantas diferentes:

Tres tipos llevaban el par cromosómico 1R en un fondo genético de trigo y otros tres tipos el par de telocéntricos de su brazo largo (1RL) también en fondo genético de trigo. Los tres tipos de cada una de estas dos categorías eran: homocigotos para la estructura cromosómica estándar (1R/1R y 1RL/1RL), homocigotos para una inversión de aproximadamente el 95% del brazo largo (1R<sub>inv</sub>/1R<sub>inv</sub> y 1RL<sub>inv</sub>/1RL<sub>inv</sub>) y heterocigotos para la inversión (1R/1R<sub>inv</sub> y 1RL/1RL<sub>inv</sub>).

Las plantas con los pares cromosómicos 1R/1R, 1R<sub>inv</sub>/1R<sub>inv</sub>, 1R/1R<sub>inv</sub>, 1RL<sub>inv</sub>/1RL<sub>inv</sub> y 1RL/1RL<sub>inv</sub> eran líneas de sustitución trigo-centeno con fondo genético del cultivar Pavon 76 en las que el par 1A estaba sustituido por el par cromosómico de centeno.

La línea ditelocéntrica 1RL/1RL es la línea disómica de adición Chinese Spring-1RL.

Las líneas de sustitución 1R/1R, 1R<sub>inv</sub>/1R<sub>inv</sub> y 1RL<sub>inv</sub>/1RL<sub>inv</sub> fueron obtenidas y proporcionadas por A. J. Lukaszewski (Universidad de California, Riverside, EEUU). Lukaszewski proporcionó igualmente dos descendencias de heterocigotos para la inversión 1RL/1RL<sub>inv</sub>. Una planta ditelocéntrica heterocigótica 1RL/1RL<sub>inv</sub> fue seleccionada en nuestro laboratorio tras efectuar el control del contenido cromosómico de las plantas que componían esas descendencias. Igualmente, los heterocigotos 1R/1R<sub>inv</sub> fueron obtenidos en nuestro laboratorio mediante cruzamiento entre homocigotos normales 1R/1R y homocigotos para la inversión 1R<sub>inv</sub>/1R<sub>inv</sub>. El origen de las líneas proporcionadas por Lukaszewski aparece descrito en un trabajo suyo (Lukaszewski, 2008).

## **1.3.- Plantas utilizadas en el análisis de los brazos 1RS, 1BS, 2RL, 2BL**

Se emplearon plantas con translocaciones 1BS/1RS de diferente tamaño y plantas con translocaciones 2BL/2RL de diferente tamaño. Las translocaciones 1BS/1RS utilizadas fueron cinco, todas ellas obtenidas por Lukaszewski et al (2005) y denominadas T9, T8, T26, T14 y T6. El cromosoma portador de las translocaciones estaba formado por el brazo 1BL de trigo y el brazo 1RS de

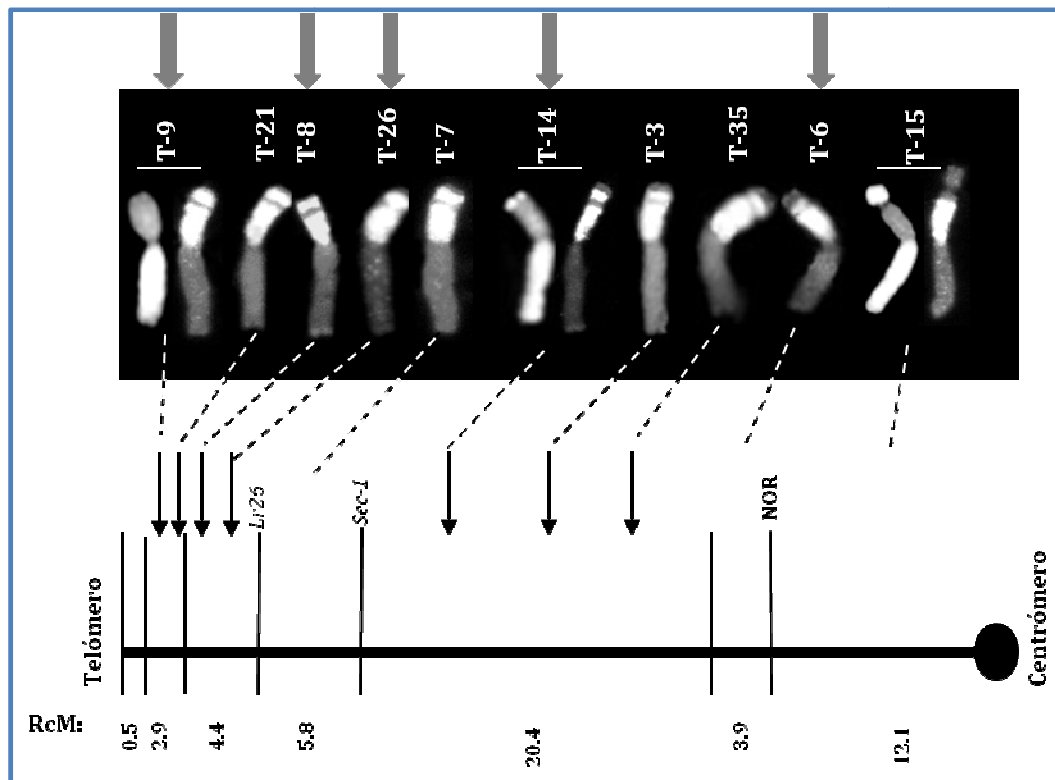
centeno cuyo segmento distal había sido translocado del 1BS de trigo, es decir, la secuencia 1BL.1RS/1BS. La longitud del segmento translocado variaba de la siguiente forma  $T9 < T8 < T26 < T14 < T6$ . En la Figura 2 aparecen reflejados estos cromosomas translocados. Las translocaciones 2BL/2RL utilizadas fueron siete. Tres de ellas 2BL+15, 2BL+19 y 2BL+12 consistían en el cromosoma 2B de trigo con un segmento translocado procedente de 2RL en el final del brazo largo. El tamaño del segmento translocado variaba según el siguiente orden  $2BL+12 < 2BL+19 < 2BL+15$ . Las otras cuatro translocaciones 2RL2, 2RL12, 2RL10 y 2RL19 se encontraban en un cromosoma compuesto por el brazo 2BS y el brazo 2RL con un segmento distal del brazo 2BL, es decir, según la secuencia 2BS.2RL/2BL. El tamaño del segmento 2BL translocado al 2RL variaba según el orden  $2RL2 < 2RL12 < 2RL10 < 2RL19$ . En la figura 3 aparece reflejada la estructura de todos estos cromosomas. Hay que señalar que tanto las translocaciones 1RS/1BS como las 2BL/2RL o 2RL/2BL fueron obtenidas por recombinación homeóloga trigo-centeno inducida en ausencia del gen *Ph1* (Lukaszewski et al., 2005).

Las doce líneas mencionadas arriba fueron proporcionadas por A. J. Lukaszewski y fueron cruzadas por dos tipos de plantas con el fin de obtenerlas en heterocigosis. Todas las líneas fueron cruzadas por Pavon 76; se hicieron al menos dos cruzamientos, y de las descendencias obtenidas se utilizaron entre tres y cinco semillas, comprobándose la presencia de la translocación en heterocigosis. Las células contenían 42 cromosomas, uno de los cuales llevaba la translocación trigo-centeno. Es decir, un par de cromosomas presentaba homología en toda su extensión excepto en la parte del segmento translocado. A todas estas plantas heterocigóticas se les aplicó la denominación PAT (de Pavon y translocación) seguido de una denominación distintiva de la translocación tal como aparece reflejado en la Tabla 1.

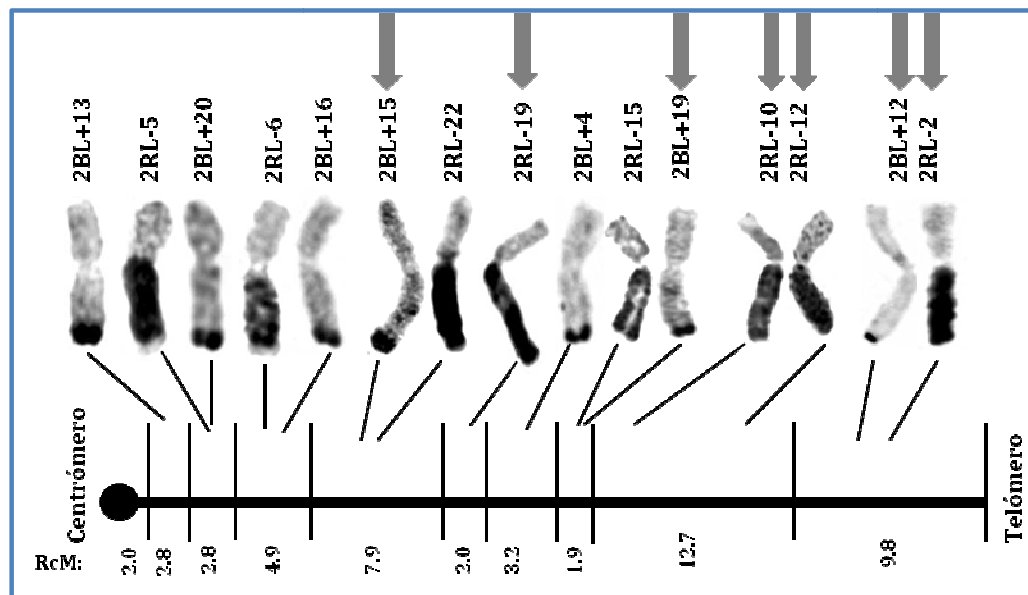
Las plantas con las translocaciones 1BS/1RS fueron además cruzadas al menos dos veces con plantas homocigóticas para la translocación Robertsoniana 1BL.1RS, es decir, para un cromosoma compuesto por los brazos 1BL y 1RS. Los descendientes heredaron el cromosoma 1BL.1RS de un parental y el cromosoma 1BL.1RS/1BS del otro parental. Esta constitución fue comprobada citológicamente. Las plantas con translocaciones 2BL/2RL fueron cruzadas, al menos dos veces, con

plantas homocigóticas para la translocación Robertsoniana 2BS.2RL. Los descendientes heredaron el cromosoma 2BS.2RL de un parental y el cromosoma 2BS.2BL/2RL o 2BS.2RL/2BL del otro. También se comprobó citológicamente la constitución cromosómica de las plantas de la descendencia. A todos estos heterocigotos se les denominó ROT (de translocación Robertsoniana) seguido de la denominación identificativa de la translocación trigo-centeno. Todos los heterocigotos analizados aparecen recogidos en la Tabla 2.

Todas las plantas utilizadas se hicieron crecer a partir de semillas germinadas en papel de filtro humedecido y al cabo de una semana se sembraron en macetas que fueron colocadas en invernadero hasta su maduración.



**Figura 2.** Mapa genético de los brazos 1BS-1RS, basado en recombinación homeóloga inducida, y cromosomas recombinantes 1RS/1BS con regiones proximales de centeno (1RS) y distales de trigo (1BS) visualizadas mediante hibridación genómica *in situ* con fluorescencia GISH según Lukaszewski et al. (2005). En la parte superior aparecen unas flechas que señalan las líneas con translocaciones 1RS/1BS utilizadas en el presente estudio.



**Figura 3.** Mapa genético de los brazos 2BL-2RL basado en recombinación homeóloga inducida y cromosomas recombinantes visualizadas mediante GISH no fluorescente. Los segmentos de centeno están marcados en negro. Los segmentos de trigo distales no son apreciados en algunos recombinantes. Imagen adaptada de Lukaszewski et al. (2005). Las flechas de la parte superior de la imagen indican las líneas recombinantes 2BL/2RL o 2RL/2BL utilizadas en el presente estudio.

**Tabla 1.** Denominación de los heterocigotos para las translocaciones 1BS/1RS y 2BL/2RL al cruzar las líneas homocigóticas para dichas translocaciones por Pavon 76.

Translocaciones	Línea original homocigótica	Heterocigotos para las translocaciones
1BS/1RS	T9	PAT9
	T8	PAT8
	T26	PAT26
	T14	PAT14
	T6	PAT6
2BL/2RL	2RL-2	PAT2RL2
	2RL-12	PAT2RL12
	2RL-10	PAT2RL10
	2RL-19	PAT2RL19
	2BL+15	PAT2BL15
	2BL+19	PAT2BL19
	2BL+12	PAT2BL12

**Tabla 2.** Denominación de los heterocigotos para las translocaciones 1BS/1RS o 2BL/2RL obtenidos en los cruzamientos con líneas homocigóticas para las translocaciones Robertsonianas 1RS.1BL o 2BS.2RL

Translocaciones	Línea original homocigótica	Translocación Robertsoniana por la que se cruza	Heterocigotos para las translocaciones
1BS/1RS	T9	1RS.1BL	ROT9
	T8	1RS.1BL	ROT8
	T26	1RS.1BL	ROT26
	T14	1RS.1BL	ROT14
	T6	1RS.1BL	ROT6
2BL/2RL	2RL-2	2BS.2RL	ROT2RL2
	2RL-12	2BS.2RL	ROT2RL12
	2RL-10	2BS.2RL	ROT2RL10
	2RL-19	2BS.2RL	ROT2RL19
	2BL+15	2BS.2RL	ROT2BL15
	2BL+19	2BS.2RL	ROT2BL19
	2BL+12	2BS.2RL	ROT2BL12



## **2. Técnicas para la observación de cromosomas por microscopía**

### **2.1.- Obtención de raíces y anteras**

Las raíces fueron utilizadas para efectuar el control de la constitución cromosómica de todas las plantas analizadas y fueron obtenidas de cada una de las semillas puestas a germinar. Las semillas fueron germinadas en placas de Petri con papel de filtro humedecido introducidas en una estufa a 25°C durante 24h. Seguidamente se colocaron a 4°C durante 72h y de nuevo se pusieron en una estufa a 25°C durante 24h. Transcurrido este tiempo se cortaron dos raíces de cada semilla que fueron sumergidas en agua en un tubo eppendorf a una temperatura de 0-4°C durante 36h para contraer los cromosomas y acumular metafases. Transcurrido este tiempo se fijaron en una solución 3:1 de etanol y ácido acético y se guardaron en nevera hasta su utilización para realizar las preparaciones. Las preparaciones efectuadas con el fin de determinar el contenido cromosómico fueron tratadas siguiendo el mismo protocolo de FISH que se describe más adelante para las anteras.

Para obtener las anteras utilizadas en meiosis, se cortaron las espigas en un estado de maduración que coincide con la presencia de meiosis en una parte de sus flores. Cada espiga se controló para detectar flores con las fases meióticas a analizar. De las tres anteras de cada flor una se utilizó para averiguar la fase meiótica realizando una preparación por squash que fue teñida con carmín acético. Cuando esa antera se encontraba en una fase meiótica adecuada, las dos anteras restantes de la misma flor se fijaban en un tubo eppendorf con una solución 3:1 de etanol y ácido acético. Las anteras fijadas se guardaron en nevera hasta su utilización, siendo renovada la solución de etanol y ácido acético dos o tres veces en los primeros días de fijación.

## **2.2.- Preparaciones citológicas para la hibridación *in situ* con fluorescencia**

El proceso comenzaba con un prelavado de las anteras seleccionadas para realizar las preparaciones. Las anteras fueron colocadas en pocillos de plástico, separadas por línea y estadio y sometidas a tres lavados consecutivos de 5 minutos cada uno con agua destilada extrayendo el agua después de cada lavado. A continuación se hicieron otros tres lavados con tampón citrato (10 mM ácido cítrico-citrato sódico, pH 4.6) de 5 minutos cada uno. Después de eliminar el tampón citrato de cada pocillo, se les aplicó un tratamiento enzimático, para destruir la pared de callosa que rodea a los meiocitos, agregando 120 µl de solución enzimática a cada grupo de anteras. La solución enzimática estaba compuesta por citohelicasa al 0.3%, pectoliasa al 0.3% y celulasa al 0.3% disueltas en tampón citrato. Las anteras se incubaron en dicha solución en una cámara húmeda a 37°C durante 25 minutos. Trascurrido ese tiempo se extrajo la solución enzimática y se agregó tampón citrato para detener la reacción enzimática.

Tras la digestión de la pared celular se realizaron las preparaciones mediante la técnica de squash. El procedimiento fue el siguiente. Se colocó una antera sobre un portaobjetos, a ésta se le agregó una gota de ácido acético al 45%. En seguida, se dispusieron dos cubreobjetos, uno de ellos al lado de la gota de ácido acético, pero sin entrar en contacto con ella y otro sobre el primero y cubriendo el material. Presionando con papel de filtro sobre el cubreobjetos que está situado sobre la muestra se golpeó suavemente sobre el material para provocar su fragmentación y dispersión. La dispersión de las células y el estado en el que se encontraban se verificó en un microscopio de contraste de fase. Una vez comprobado que las células estaban en el estadio adecuado y suficientemente separadas, se retiró el primer cubreobjetos. La preparación se congeló en nitrógeno líquido para permitir que las células se fijaran al portaobjetos y así poder retirar el cubreobjetos. Una vez hecho esto fueron sumergidas en etanol al 100%.

### 2.3.- Hibridación *in situ* con fluorescencia

Antes de comenzar con la hibridación se realizó un pretratamiento, consistente en tres lavados consecutivos en 2xSSC (100ml de 20xSSC (175,3 gr de C1Na + 88,3 gr de citrato sódico + H<sub>2</sub>O destilada hasta 1L) +900 ml de H<sub>2</sub>O destilada) de 5 minutos, de los cuales dos fueron a temperatura ambiente (TA), y el tercero a 37°C. A continuación se incubaron en una solución de pepsina (98 ml de H<sub>2</sub>O + 1 ml HCl + 1 ml pepsina 5%) durante 7 minutos a 37°C. Las preparaciones se lavaron en 2xSSC durante 5 minutos a TA, se sumergieron en paraformadehído al 4% en 1xSSC por 5 minutos para su fijación. Se realizaron dos lavados más de 5 minutos en 2xSSC a TA. Finalmente se deshidrataron en una serie de etanol al 70%, 90% y 100% durante 3 minutos respectivamente y se dejaron secar al aire.

La mezcla de hibridación fue preparada calculando 20 µl por preparación. Las sondas utilizadas para el estudio de la sinapsis y la cantidad utilizada por preparación se pueden ver en la tabla 3. De los 20 µl, por preparación, 10 µl corresponden a una solución al 20% (p/v) de sulfato de dextrano “20DS” en tampón de hibridación “HB50” (50% formamida (5ml), 2xSSC, tampón fosfato sódico 0.5 M (1 ml, 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, mezclar hasta pH7)), y los otros 10 µl al volumen de mezcla de sondas marcadas con digoxigenina y biotina completada con HB50.

Para detectar la hibridación *in situ* los clones fueron marcados por nick translation con biotina 16-dUTP ó digoxigenina 11-dUTP. Para facilitar la comprensión de este apartado se considerará por separado el marcaje utilizado para cada uno de los análisis en los tres tipos de construcción cromosómica: delección del5RL, inversión 1RL<sub>inv</sub> y translocaciones 1BS/1RS y 2BL/2RL.

En el análisis del efecto de la delección del5RL se estudió la posición del extremo de los brazos 5RS en las plantas homocigóticas 5R/5R y del5R/del5R y en el heterocigoto 5R/del5R. Para este análisis se marcaron las sondas teloméricas (pAt74) y centromérica (pAWRC.1) con biotina 16-dUTP y la sonda pSc74 para cromómeros heterocromáticos con digoxigenina 11-dUTP. En el análisis del desarrollo de la sinapsis de los cromosomas de centeno en estas mismas plantas, las sondas teloméricas y centroméricas (pAt74 y pAWRC.1, respectivamente) se marcaron con digoxigenina 11-dUTP, y las sondas pSc74, para heterocromatina

constitutiva, y pUCM600, para cromosomas de centeno, se marcaron con biotina 16-dUTP. Para la identificación de los cromosomas de centeno en metafase I, los clones pAWRC.1 y pUCM600 se marcaron con biotina 16-dUTP y el clon pSc74 con digoxigenina 11-dUTP.

Para el análisis del efecto de la inversión 1RL<sub>inv</sub> se estableció la posición de los centrómeros y cromómeros de heterocromatina de centeno marcando los clones pAt74 y pAWRC.1 con biotina 16-dUTP y el clon pSc74 con digoxigenina 11-dUTP. En el análisis de la sinapsis de los cromosomas de centeno las sondas de DNA específicas de centeno pAWRC.1, pSc74 y pUCM600 fueron marcadas con biotina 16-dUTP y la sonda pAt74 con digoxigenina 11-dUTP. Para estudiar la recombinación entre cromosomas de centeno en anafase I- telofase I, las sondas pUCM600 y pAWRC.1 fueron marcadas con biotina 16-dUTP y pSc74 con digoxigenina 11-dUTP.

Para estudiar la sinapsis en las translocaciones 1BS/1RS y 2BL/2RL las sondas pAWRC.1, pSc74 y pUCM600 fueron marcados con biotina 16-dUTP y la sonda pAt74 con digoxigenina 11-dUTP. Para el análisis de metafase I y anafase I los clones pUCM600 y pAWRC.1 fueron marcados con biotina 16-dUTP y los clones pSc74 y pAt74 con digoxigenina 11-dUTP.

La mezcla de hibridación añadida a las preparaciones se calentó en el termociclador a 80°C durante 2 minutos para desnaturalizar el material y las sondas. Una vez desnaturalizadas se dejaron en una cámara húmeda a 37°C durante toda la noche para la hibridación.

**Tabla 3.** Sondas utilizadas en la hibridación *in situ* con fluorescencia.

Nombre	Localización y origen	Cantidad por preparación	Referencia
pAtT4	Repeticiones en tándem, telómeros de <i>A. Thaliana</i>	1 µl	Richards y Ausubel, 1988
pAWRC.1	Repeticiones centroméricas en tándem específicas de centeno	1.8 µl	Franki, 2001
pSc74	Repetición en tándem de 480 pb específicas de centeno	1.6 µl	Bedbrook et al., 1980; Cuadrado y Schwarzscher, 1998
pUCM600	Repetición específica de centeno derivada de la familia R173	1.8 µl	Gonzalez-García et al., 2011; Rogowsky et al., 1992

#### 2.4.- Detección de la hibridación

Al día siguiente las preparaciones se sometieron a tres lavados, para eliminar las sondas de DNA que no se habían unido a los cromosomas. Primero se depositaron en un pocillo con 2xSSC por 30 minutos a TA y a continuación se pasaron a un pocillo con 0.1xSSC (5ml 2XSSC+ 95ml H<sub>2</sub>O) durante 15 minutos a 48°C, y finalmente se lavan en 2xSSC durante 15 minutos a TA. Después se bloquean las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos introduciendo las preparaciones en 4B (0.5 gr de leche desnatada en polvo en 4xSSC (20 ml 20xSSC + 80 ml H<sub>2</sub>O destilada)) durante 30-40 minutos a 37°C.

Las sondas marcadas con digoxigenina se detectaron con 6-8 ng/µl del anticuerpo antidigoxigenina conjugado con FITC (Sigma, St Louis) en 4B (0,5% reactivos bloqueantes en 4xSSC) y las sondas marcadas con biotina con 10-15 ng/µl de avidin conjugada con Cy3 (Sigma) en 4B. Cada preparación se incubó con 75µl de la mezcla de anticuerpos diluida en 4B en una cámara húmeda por 1 hora a 37°C en oscuridad. Desde el momento en que las preparaciones se sacaron de la estufa, permanecieron tapadas para evitar que la luz, alterara la fluorescencia. Tras

sacarlas de la estufa se realizaron dos lavados consecutivos en 4T (200 ml de 20xSSC+ 0.5 ml tween 20+ 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada) de 5 minutos cada uno a 37°C. Luego se introdujeron en un pocillo con 4xSSC durante 5 minutos con agitación y a TA, para volver a deshidratar en etanol al 70%, 90% y 100% respectivamente. Después se dejaron secar y se les añadió 5ng/μl de DAPI (995 μl H<sub>2</sub>O destilada+ 5 μl de solución original de DAPI (6 diamidina-2-fenilindol-dihidroclorohidrato)) para contrateñir durante 5 minutos en oscuridad. Después de dos lavados consecutivos de 5 minutos en H<sub>2</sub>O destilada, se volvieron a deshidratar en la serie alcohólica al 70%, 90% y 100% respectivamente. Un vez secas, a cada preparación se le agregaron 10-15 μl de Vectashield para montar el cubre. El material se guardó a 4°C en una caja oscura hasta su observación.

## **2.5.- Microscopía de fluorescencia y procesamiento de imágenes**

En este estudio se utilizaron dos tipos de microscopios. Para determinar el efecto de la delección las células fueron estudiadas en un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 equipado con epifluorescencia óptica, motorización del eje Z y una cámara digital Olympus DP71 controlada por el análisis del software analySIS pro (Soft Imaging System). Las series de planos focales de cada núcleo fueron analizadas y procesadas usando el software de dominio público ImageJ (National Institutes of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Las imágenes finales fueron procesadas con el software Adobe Photoshop 7.0. El software ImageJ también fue usado para medir las proyecciones en 2D del corte principal de cada núcleo en leptotena, así como la distancia de los centrómeros y extremos de cromosoma 5RS de centeno al centro del agrupamiento de telómeros (bouquet). Para el análisis de la inversión y de las líneas de translocación se utilizó un microscopio de epifluorescencia BX60 (Olympus Optical Co., GmbH, Alemania) equipado con una cámara digital CCD DP70 (Olympus Optical Co., GmbH, Alemania). Las imágenes fueron optimizadas con Photoshop CS4 y CS5. Y la medición del tamaño de los segmentos translocados en paquitena fue calculado con Photoshop CS5.

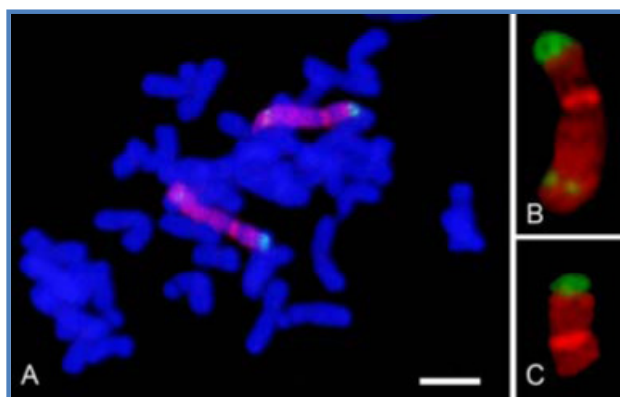
## **RESULTADOS**

## RESULTADOS

### 1. Análisis del cromosoma 5R de centeno

#### 1. 1. -La delección presente en 5RL afecta a la sinapsis de 5RS

La presencia de la delección se detectó mediante el análisis con FISH de las células meristemáticas de raíz. La primera planta donde se localizó dicha delección era heterocigótica para esta anomalía estructural y mostraba grandes diferencias en el tamaño del par 5R. La delección tenía una longitud de aproximadamente el 70% del brazo largo y la ausencia de su cromómero subterminal indicaba que la pérdida incluía el 70% distal de dicho brazo. En la figura 4 se muestran los cromosomas 5R normal y del5R donde se pueden apreciar claramente las diferencias entre ellos. Entre la descendencia de esta primera planta heterocigótica pudieron detectarse fácilmente los homocigotos para la delección mediante control mitótico. El análisis del efecto de la delección sobre el apareamiento homólogo, sinapsis y recombinación se realizó estudiando el comportamiento del par 5R en los dos tipos de homocigotos y en el heterocigoto.



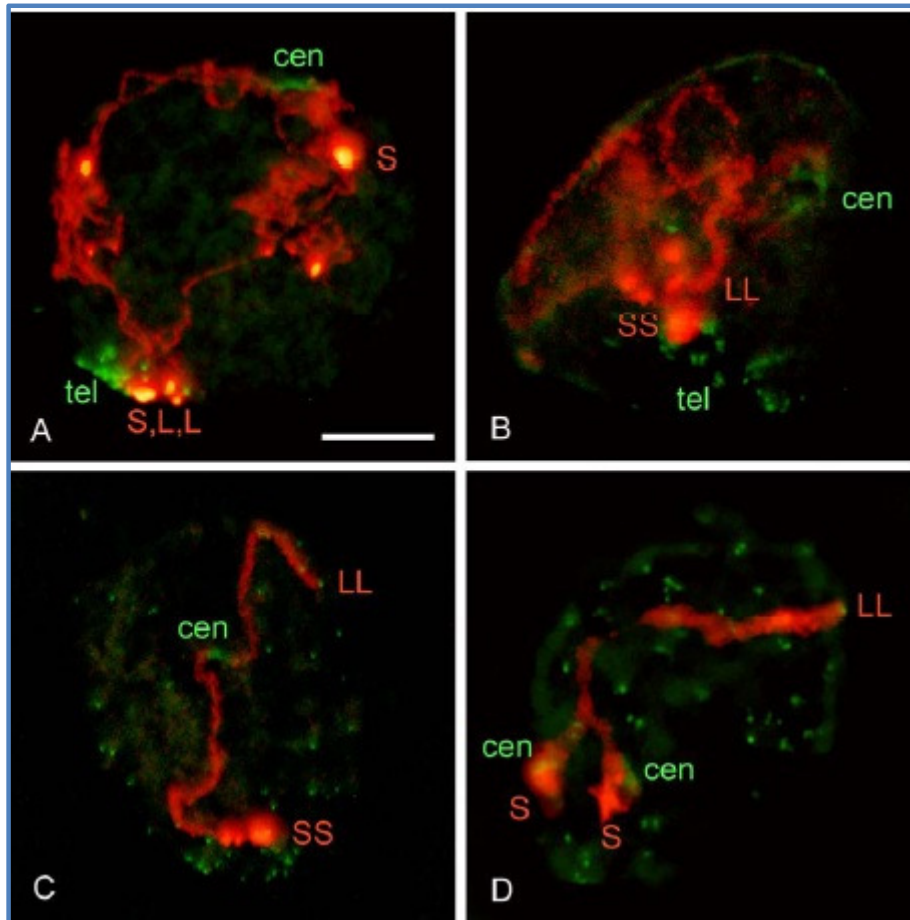
**Figura 4.** Cromosomas 5R estándar y deficiente identificados por FISH con diferentes sondas. Los cromómeros heterocromáticos (verde), el centrómero (rojo fuerte) y el resto de la cromatina de centeno (rojo débil) fueron marcados con las sondas pSc74, pAWRC.1, y pUCM600, respectivamente. A) Metafase mitótica de la línea de adición trigo-5R, los cromosomas de trigo están en azul. B) cromosoma normal 5R. C) cromosoma deficiente del5R.

Para determinar si la pérdida del 70% distal de 5RL tuvo algún efecto en el inicio y progresión de la sinapsis, analizamos mediante FISH la disposición del par de cromosomas de centeno en células madres de polen (CMPs) desde leptotena a paquitena en la línea homocigótica normal (5R/5R), en la línea homocigótica para



la delección (del5R/del5R) y en el heterocigoto (5R/del5R). El marcaje de los telómeros permitió la identificación de diferentes subestados de la profase I temprana (Figura 5). Los telómeros forman agregados en leptotena temprana, los cuales convergen en un apretado grupo en la transición leptotena-cigotena. Conjuntamente con la formación de la estructura del bouquet, la cromatina experimenta un cambio conformacional que resulta en la elongación del cromosoma (Maestra et al., 2002). El agrupamiento de telómeros se desintegra en cigotena media, a medida que progresa la sinapsis. Los telómeros aparecen dispersos completamente en cigotena tardía y paquitena, estados que pueden ser identificados por un diferente grado de condensación de la cromatina.

En leptotena y cigotena temprana, los dos cromosomas homólogos de centeno ocupan territorios nucleares separados en la mayoría de las CMPs (Maestra et al., 2002) y centramos nuestro análisis en la detección de la existencia o no de asociaciones entre regiones distales del cromosoma en ambos brazos. El extremo del brazo corto fue identificado por la presencia de una banda de heterocromatina brillante revelada por la sonda pSc74, que se subdividía en tres cromómeros tras la elongación del cromosoma (Figura 5). El extremo del brazo largo carecía de protuberancia heterocromática tanto, en el cromosoma estándar como en el delecionado (Figura 5A). Inicialmente las frecuencias de asociaciones distales fueron bajas en ambos brazos (Tabla 4) y se incrementaron al producirse la agrupación telomérica. Los extremos 5RL aparecían próximos entre sí más frecuentemente que los extremos 5RS en la línea estándar, pero con menor frecuencia en la línea homocigótica para la delección. En el heterocigoto no se observó asociación distal de los brazos del5RL y 5RL.



**Figura 5.** Disposición de los pares de homólogos 5R-5R y del5R-del5R en profase I temprana. Los centrómeros de centeno y todos los telómeros están marcados en verde y los brazos cromosómicos de centeno en rojo. S indica el extremo de 5RS y L el extremo de 5RL y del5RL. A) CMP en la transición leptotena-cigotena con dos extremos L y uno S del cromosoma normal 5R en el polo telomérico. Los dos extremos L están separados. B) CMP homocigótica del5R/del5R en cigotena media mostrando un bouquet parcialmente desorganizado, sinapsis en la parte distal de del5R, asociación íntima de los cromómeros distales 5RS y alineamiento de los dos cromómeros subdistales de 5RS. C) CMP homocigótica del5R/del5R en cigotena tardía con sinapsis completa entre los dos cromosomas de centeno. D) CMP de homocigótica 5R/5R en paquitena con un 90% de sinapsis en 5RL y asinapsis en el resto del cromosoma.

Es sabido que la sinapsis comienza distalmente y progresa desde el extremo hacia el centro del cromosoma (Corredor et al., 2007). La progresión de la sinapsis en cada brazo cromosómico a través de cigotena y paquitena se evaluó estableciendo el porcentaje de meiocitos que presentaban sinapsis completa o niveles de sinapsis superiores al 90% (Figura 5B-D).

**Tabla 4.** Frecuencia (%) de CMPs en leptotena temprana (EL) y en la transición leptotena-cigotena (LLEZ) mostrando los brazos homólogos 5RS o 5RL asociados distalmente en homocigotos 5R/5R, del5R/del5R y heterocigotos 5R/ del5R.

Línea	Etapas	5RS	5RL	CMPs
5R/5R	EL	8,7	19,6	92
	LLEZ	16,4	26,4	110
del5R/del5R	EL	21,2	13,6	66
	LLEZ	21,9	16,4	73
5R/del5R	EL	16,2	0	50
	LLEZ	22,8	0	70

La tabla 5 muestra el porcentaje de las CMPs en cigotena media, tardía y paquitena en los tres genotipos estudiados. Los homocigotos 5R/5R y del5R/del5R alcanzaron niveles similares de sinapsis en paquitena (87,3% y 93,8% respectivamente,  $\chi^2$  de contingencia= 2,19,  $p > 0,10$ ). Sin embargo, los homocigotos para la delección completaron la sinapsis antes que los homocigotos para el cromosoma estándar, tal como se deduce de los porcentajes 62,7% y 82,0%, observados en cigotena tardía respectivamente ( $\chi^2$  de contingencia = 7,43,  $p < 0,01$ ). La diferencia de tamaño de los brazos 5RL estándar y del5RL da cuenta de una finalización más rápida de la sinapsis en la línea con la delección. La heterocigosis para la delección provocó fallos en la sinapsis tal como se deduce del porcentaje de 70,2% de CMPs con segmentos homólogos de 5RL y del5RL asociados en paquitena. Este nivel es más bajo que el de los homocigotos 5R/5R ( $\chi^2$  de contingencia= 5,70,  $p < 0,05$ ) y del5R/del5R ( $\chi^2$  de contingencia= 15,84,  $p < 0,001$ ).

El brazo 5RS, por no estar involucrado en la delección, se esperaba que mostrara un comportamiento similar en las tres líneas. Sin embargo, este no fue el caso. Los homocigotos para la delección alcanzaron un nivel más alto de sinapsis que los homocigotos estándar en cualquier subestadio de la profase I:  $\chi^2$  de contingencia= 16,2,  $p < 0,001$  para CMPs en cigotena media;  $\chi^2$  de contingencia= 20,1,  $p < 0,001$  para CMPs en cigotena tardía; y  $\chi^2$  de contingencia= 5,9,  $p < 0,05$

para CMPs en paquiten. Los heterocigotos mostraron niveles de sinapsis intermedios entre ambos homocigotos. Esto implica que la estructura, estándar o delecionada, del brazo 5RL condiciona el comportamiento de 5RS en lo que respecta a apareamiento y sinapsis.

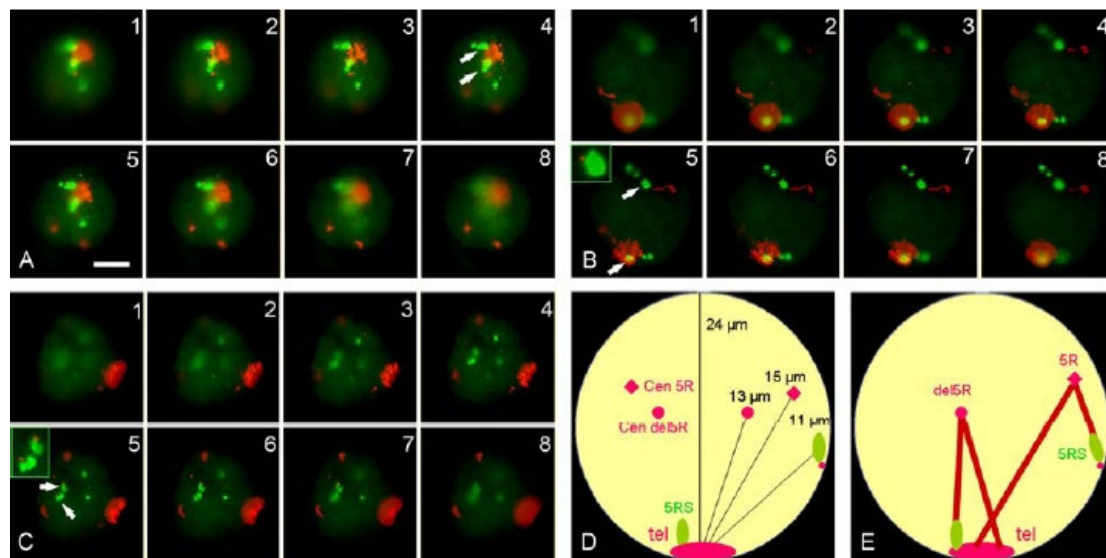
**Tabla 5.** Frecuencia (%) de CMPs en cigotena media (MZ), cigotena tardía (LZ) o paquiten (P) con sinapsis superior al 90% en los brazos 5RS o 5RL (o del5RL) en homocigotos 5R/5R y del5R/del5R y en heterocigotos 5R/del5R.

Línea	Etap	5RS	5RL/del5RL	CMPs
5R/5R	MZ	17.6	37.9	108
	LZ	50.8	62.7	59
	P	66.2	87.3	71
del5R/del5R	MZ	41.9	44.3	124
	LZ	84.0	82.0	100
	P	82.0	93.8	97
5R/del5R	MZ	22.6	21.7	106
	LZ	48.4	39.6	91
	P	70.2	70.2	57

### 1.2.- La posición del brazo 5RS en el bouquet condiciona su sinapsis

La deleción produce una severa modificación de la conformación del cromosoma 5R. Mientras que el brazo largo es dos veces el tamaño del brazo corto en el cromosoma estándar, del5RL es más corto que 5RS (Figura 4). Obviamente la dimensión del territorio nuclear ocupado en el núcleo interfásico por los cromosomas, o sus brazos, está relacionado con la cantidad de cromatina que contienen. En núcleos en interfase premeiótica, los cromosomas adoptan la configuración de Rabl (Maestra et al., 2002) con los telómeros localizados en el hemisferio opuesto al polo donde se sitúan los centrómeros. En esta configuración, la posición relativa de centrómeros y telómeros de dos cromosomas dados puede verse afectada por el tamaño de sus brazos. Como los telómeros migran durante leptotena y se agrupan en una pequeña superficie de la membrana nuclear, su incorporación al grupo puede estar condicionada por la distancia que tienen que recorrer. Es posible que la deleción pueda afectar la disposición espacial de 5RS en

núcleos presinápticos y la incorporación de su extremo al polo telomérico. A la luz de esta hipótesis analizamos la disposición topológica del agregado de telómeros, de los centrómeros de centeno y de los extremos de los brazos 5RS de meiocitos en la transición leptotena-cigotena en las tres líneas estudiadas. Para ello hicimos un análisis tridimensional (3D) de cada núcleo. El extremo del brazo cromosómico 5RS fue detectado por el marcaje con digoxigenina de los cromómeros de herocromatina adyacentes; los centrómeros de centeno y todos los telómeros fueron marcados con biotina (Figura 6A-C). El telómero de 5RS adyacente a los cromómeros heterocromáticos era evidente en CMPs en las que aparecía apartado del agregado de telómeros (Figura 6B, C).



**Figura 6.** Análisis tridimensional de la disposición topológica del agregado de telómeros (rojo), de los centrómeros de centeno (rojo) y de los cromómeros de 5RS (verde, flechas) en la etapa de bouquet. A) CMP homocigótica 5R/5R mostrando los dos cromómeros heterocromáticos distales en el polo telomérico. B) CMP homocigótica del5R/del5R con sólo un extremo del brazo 5RS en el polo de los telómeros, el telómero adyacente del otro cromómero heterocromático 5RS es mostrado en el inserto. C) CMP homocigótica 5R/5R con ambos extremos fuera del polo telomérico, los telómeros son mostrados en el recuadro insertado. D) Representación 2D de los núcleos en estado de bouquet mostrando las distancias promedio de los centrómeros de centeno y de los cromómeros heterocromáticos no agrupados al agregado telomérico. E) Disposición de 5R y del5R en el estado de bouquet representando una capacidad diferente del telómero de 5RS para migrar al polo telomérico.

Los núcleos estudiados fueron agrupados en tres categorías: núcleos con ambos extremos de 5RS en el grupo de telómeros, núcleos con sólo un extremo de 5RS en el polo telomérico y núcleos con ambos extremos fuera del agregado de telómeros. Las frecuencias de estos tipos de núcleos figuran en la Tabla 6. Los núcleos con ambos extremos 5RS en el conglomerado de telómeros son más

abundantes en los homocigotos para la delección que en la línea estándar ( $\chi^2$  de contingencia= 13,2,  $p < 0.01$ ) o que en los heterocigotos ( $\chi^2$  de contingencia= 17,5,  $p < 0,001$ ). Esto significa que el telómero de 5RS del cromosoma deficiente alcanza más fácilmente el polo telomérico que el del cromosoma normal. Una migración más retrasada o alterada de uno o ambos telómeros 5RS, seguido de una reducción en el nivel de sinapsis, de este brazo demuestra la relevancia de la posición presináptica del extremo del cromosoma en el apareamiento homólogo.

**Tabla 6.** Frecuencia (%) de CMPs en la transición leptotena-cigotena con los dos extremos 5RS, sólo uno, o ninguno en el polo telomérico en homocigotos 5R/5R y del5R/del5R y en heterocigotos 5R/del5R.

Línea	Extremos 5RS en el polo telomérico			CMPs
	2	1	0	
5R/5R	33,9	45,2	20,9	62
del5R/del5R	64,4	30,5	5,1	59
5R/del5R	27,4	54,8	17,8	62

La separación física entre el conglomerado de telómeros y cada cromómero heterocromático 5RS o cada centrómero de centeno, así como el diámetro del núcleo fueron medidos en las proyecciones 2D de los meiocitos estudiados. Los valores medios de tales distancias están indicados en la Figura 6D. El esquema muestra uno o dos extremos del cromosoma 5RS separados del agrupamiento de telómeros. La distancia promedio entre el cromómero 5RS desplazado y el agregado de telómeros fue de 11,1  $\mu\text{m}$  en homocigotos 5R/5R, 10,9  $\mu\text{m}$  en homocigotos del5R/del5R y 10,5  $\mu\text{m}$  en heterocigotos. Estas distancias representan casi la mitad del diámetro nuclear. Los centrómeros de 5R ocuparon una posición más lejana en relación al polo telomérico (15 $\mu\text{m}$ ) que los centrómeros de del5R (13 $\mu\text{m}$ ). La diferencia en el tamaño entre los brazos 5RL y del5RL puede explicar la variación de la posición de sus centrómeros dentro del núcleo en la transición leptotena-cigotena tal como se representa en la figura 6E. Esta disposición cromosómica permite una incorporación de los telómeros 5RS al grupo de telómeros más fácilmente en el caso del cromosoma del5R que en el de su homólogo 5R. Por tanto, la conformación del cromosoma condiciona su topología y

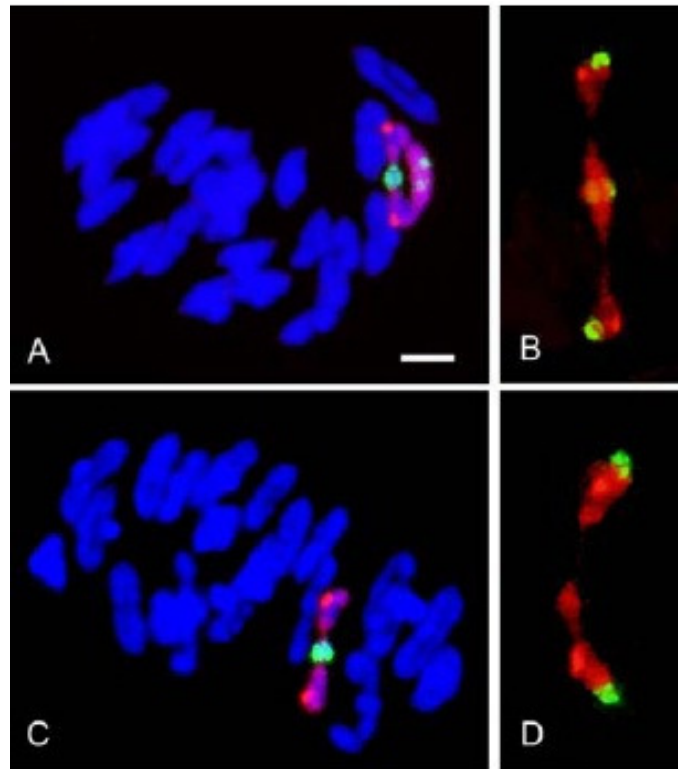
el movimiento de sus extremos en el núcleo presináptico y por ende, su apareamiento y sinapsis.

### 1.3.-Efectos opuestos de la delección en la frecuencia de quiasmas de los dos brazos del cromosoma 5R

La frecuencia de quiasmas formados por el par de cromosomas de centeno fue estimada a partir de la frecuencia de brazos unidos en metafase I (MI) (Tabla 7). Hubo una severa reducción del número de quiasmas en el cromosoma con el brazo deficiente comparado con el del brazo normal 5RL. Las asociaciones quiasmáticas de 5RL alcanzaron una frecuencia de 83,2% en los homocigotos estándar mientras que del5RL estuvo unido en sólo el 11% de los CMPs, en los homocigotos para la delección, y no se observaron uniones en los heterocigotos. Los quiasmas formados en el brazo intacto 5RL estaban localizados en su mitad distal no observándose bivalentes con quiasmas proximales. Los pocos quiasmas formados en el brazo del5RL en homocigotos para la delección presentaban localización muy distal (Figura 7). Las uniones quiasmáticas de 5RS mostraron una posición subdistal y su frecuencia fue afectada por la delección. Los homocigotos del5R/del5R mostraron el brazo 5RS unido más frecuentemente que la línea estándar ( $\chi^2$  de contingencia= 6,6,  $p < 0,05$ ) y, en los heterocigotos, la frecuencia de asociación fue intermedia entre la de los dos homocigotos. Estos resultados son consistentes con las diferencias observadas entre las líneas para el nivel de sinapsis en paquitena.

**Tabla 7.** Frecuencia (%) de brazos unidos en metafase I para el par de cromosomas de centeno en homocigotos 5R/5R y del 5R/del5R y en heterocigotos 5R/del5R.

Línea	brazos	unidos	CMPs
	5RS	5RL	
5R/5R	36.4	83.2	173
del5R/del5R	51.7	11.9	118
5R/del5R	44.7	0	123



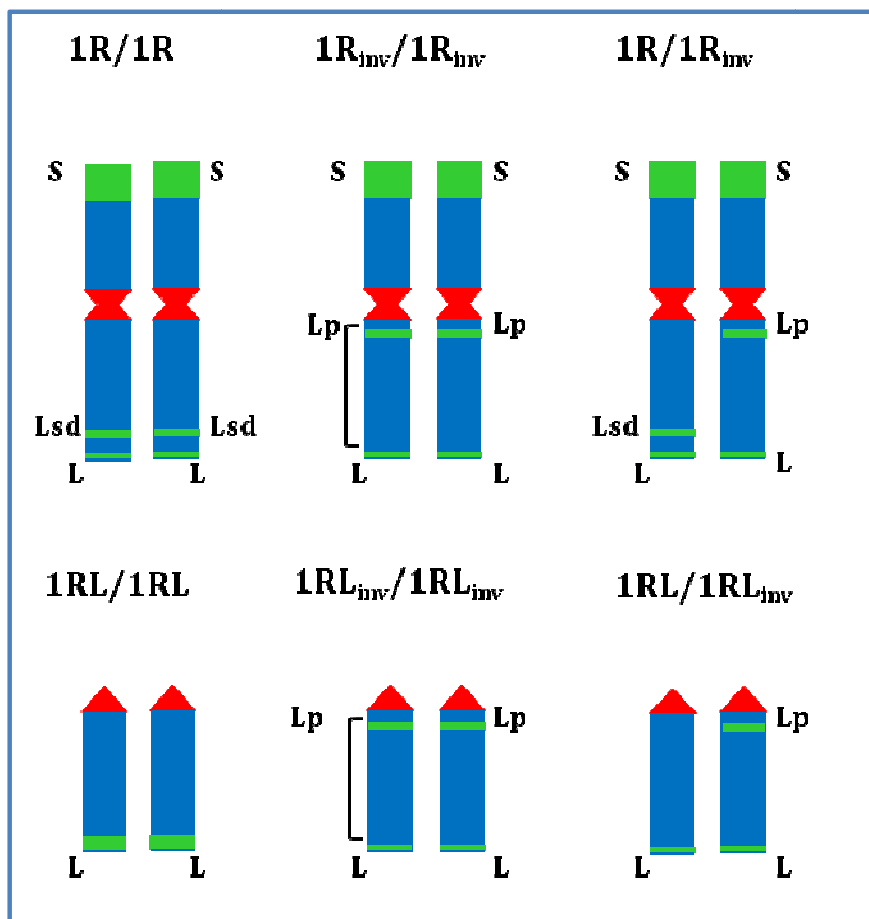
**Figura 7.** Bivalentes formados en metafase I por el cromosoma 5R normal y el deficiente, que fueron marcados como en la Fig 4. A) CMP homocigótica 5R/5R en metafase I con 21 bivalentes de trigo (azul) y el bivalente 5R de centeno cerrado (multicolor). B) Bivalente 5R abierto con al menos un quiasma en la mitad distal del brazo largo. Puede observarse la costricción en el extremo del tercio proximal de 5RL. C) CMP homocigota del5R/del5R en metafase I con 21 bivalentes de trigo (azul) y el bivalente de centeno con el brazo 5RS asociado (multicolor). D) Bivalente de centeno con una asociación muy distal del brazo del5RL.

## 2. Análisis del brazo 1RL de centeno

### 2.1.-Marcadores del cromosoma 1R

La estructura de cada cromosoma en mitosis de las seis líneas de adición trigo-centeno se representa en la Figura 8. Las bandas verdes indican los cromómeros de heterocromatina, que fueron detectados por FISH usando la sonda pSc74. El centrómero fue detectado por el clon pAWRC.1, mientras que el clon pUCM600 fue usado para detectar el resto del cromosoma. El brazo corto del cromosoma 1R lleva un gran cromómero (S) de heterocromatina y el brazo largo tiene dos cromómeros heterocromáticos distal (L) y subdistal (Lsd), que se distinguen por el tamaño de la señal.





**Figura 8.** Estructura del par de cromosomas de centeno estudiados en fondo genético de trigo. Las líneas de trigo disómicas para la introgresión del cromosoma 1R o del telocéntrico de su brazo largo (1RL) eran homocigóticas para el cromosoma estándar (1R/1R y 1RL/1RL), homocigóticas para la inversión paracéntrica del brazo 1RL (1R<sub>inv</sub>/1R<sub>inv</sub> y 1RL<sub>inv</sub>/1RL<sub>inv</sub>) o heterocigóticas (1R/1R<sub>inv</sub> y 1RL/1RL<sub>inv</sub>). El tamaño aproximado de la inversión se indica en los homocigotos. Los centrómeros (rojo) y las bandas de heterocromatina (verde) son marcadores específicos de centeno que fueron identificados por FISH.

En el cromosoma invertido el cromómero subdistal se sitúa en la zona próxima al centrómero (Lp). Los heterocigotos 1RL/1RL<sub>inv</sub> carecen de la señal subdistal del brazo largo 1RL, lo cual indica la pérdida de su cromómero subdistal. La línea homocigota 1RL/1RL lleva solo un cromómero distal (L) que se visualiza como una gran señal.

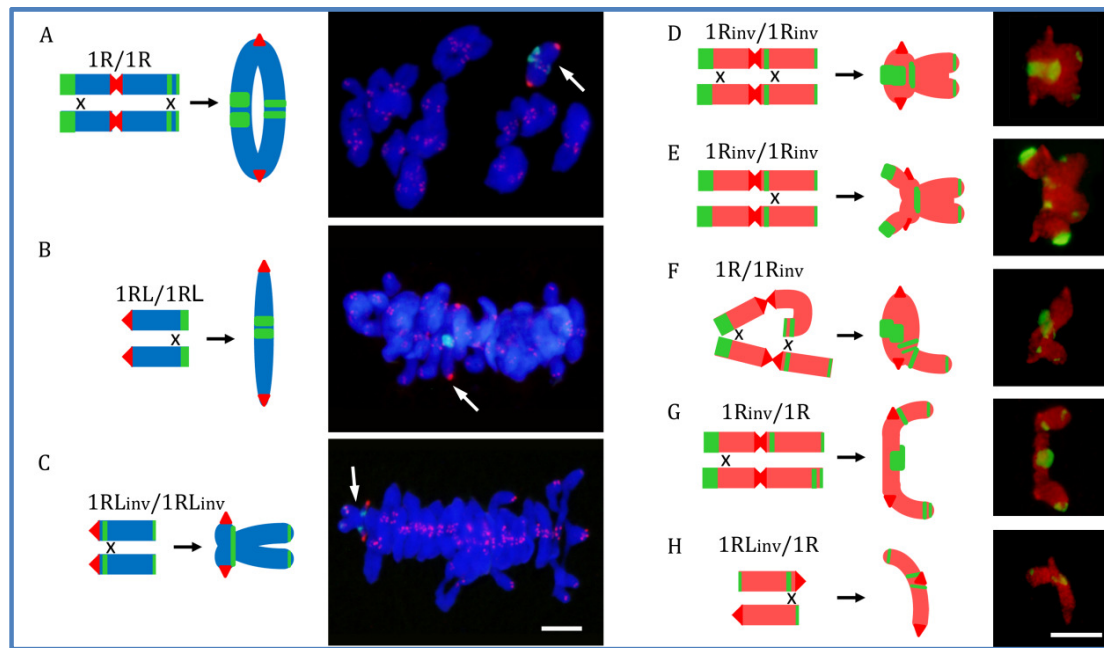
## 2.2.-La posición de los sobrecruzamientos en el brazo 1RL

En MI los cromosomas de centeno estuvieron apareados en la mayoría de las CMPs (Figura 9). Se observaron algunas CMPs con dos univalentes de centeno en las líneas homocigóticas para la inversión, en los heterocigotos y en la línea

ditelocéntrica normal 1RL/1RL. Las frecuencias de asociación de cada brazo cromosómico se observan en la Tabla 8. Las frecuencias más altas corresponden a las líneas homocigóticas para la ordenación estándar, es decir, 1R/1R y 1RL/1RL. La inversión causó una reducción considerable en la frecuencia de brazos unidos del brazo largo y asimismo, modificó la posición de los quiasmas en el cromosoma. En los homocigotos 1R/1R y 1RL/1RL, todas las uniones que se observaron entre los brazos 1RL fueron distales o subdistales (Figura 9A, B), mientras que en los homocigotos con la inversión dichas uniones fueron proximales (Figura 9C-E). En los heterocigotos las uniones eran distales en un cromosoma y proximales en el homólogo (Figura 9F, H). Debido a la condensación de la cromatina resulta muy difícil determinar el número de quiasmas formados en cada bivalente y definir su posición exacta.

**Tabla 8.** Frecuencia de asociación (%) de los brazos cromosómicos 1RL y 1RS de centeno en metafase I en las seis líneas trigo-centeno estudiadas y frecuencia (%) de la configuración puente + fragmento acéntrico en anafase I en heterocigotos para la inversión.

Línea	Metafase I			Anafase I	
	1RS	1RL	CMPs	Puente + fragmento	CMPs
<b>1R/1R</b>	91,1	98,9	90		
<b>1R<sub>inv</sub>/1R<sub>inv</sub></b>	66,7	62,1	66		
<b>1R/1R<sub>inv</sub></b>	82,8	20,0	320	20,6	320
<b>1RL/1RL</b>		95,1	102		
<b>1RL<sub>inv</sub>/1RL<sub>inv</sub></b>		78,8	137		
<b>1RL/1RL<sub>inv</sub></b>		53,4	318	47,3	317

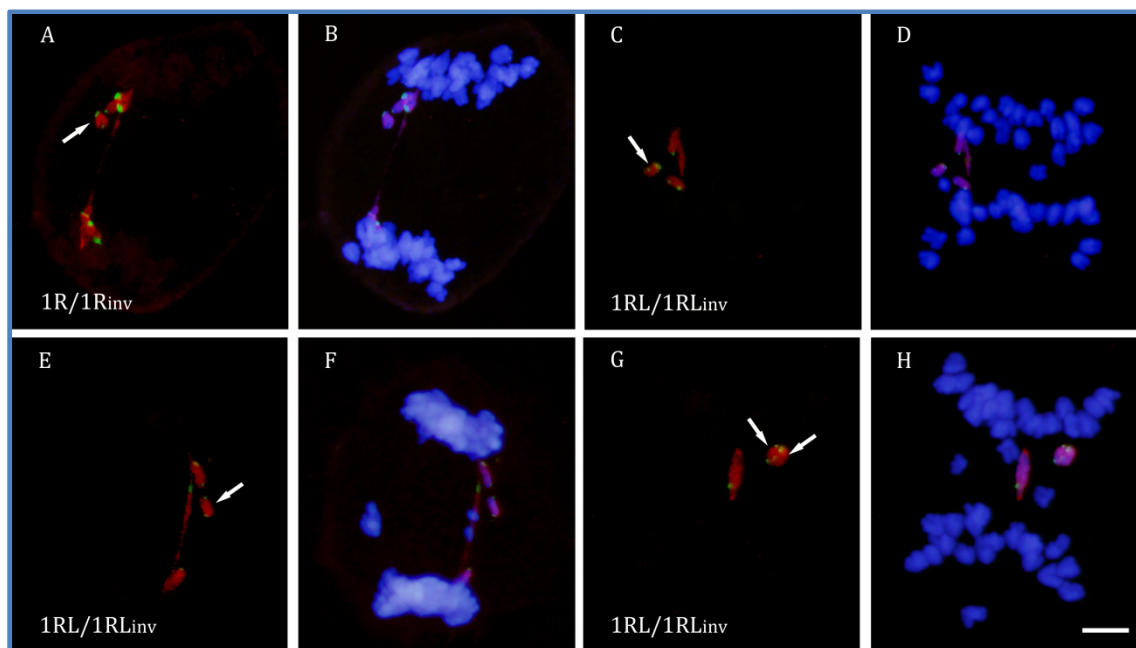


**Figura 9.** Ubicación proximal y distal de los quiasmas entre cromosomas con dos brazos o cromosomas telocéntricos y morfología de los bivalentes observados en MI en diferentes líneas de introgresión trigo-centeno. Los dibujos muestran la posición de los quiasmas en cada bivalente. A-C) El bivalente de centeno (flecha) fue identificado por FISH con la sonda de ADN centromérica pAWRC.1 (señales rojas más intensas) y la sonda pSc74 (verde). Los telómeros de todos los cromosomas (señales rojas más débiles) también fueron marcados. Ambos cromosomas, trigo y centeno fueron teñidos con DAPI. D-H) Los bivalentes de centeno fueron identificados con sondas de ADN pUCM600 (rojo), pAWRC.1 (rojo más luminoso) y pSc74 (verde). La barra representa 10  $\mu$ m.

La frecuencia de quiasmas fue estimada en los heterocigotos para la inversión paracéntrica (se llaman así a las inversiones como la de 1RL, que no incluyen el centrómero) mediante observaciones realizadas en CMPs que se encontraban en anafase I (AI). Cuando tiene lugar un sobrecruzamiento simple en el segmento invertido en dichos heterocigotos, en AI se observa la configuración denominada puente + fragmento acéntrico (Figura 10, Figura 11). La frecuencia de la configuración puente + fragmento acéntrico que involucra al brazo 1RL en heterocigotos 1R/1R<sub>inv</sub> y 1RL/1RL<sub>inv</sub> aparece en la Tabla 8. Los valores obtenidos indican una estrecha correspondencia entre la frecuencia de asociación en MI y la frecuencia de recombinación deducida de las configuraciones puente + fragmento acéntrico en AI ( $\chi^2 = 0,04$ , grados de libertad=1,  $p > 0,80$ , para 1R/1R<sub>inv</sub> y  $\chi^2 = 1,17$ , grados de libertad=1,  $p > 0,50$  para 1RL/1RL<sub>inv</sub>). Es decir, las uniones observadas en MI se corresponden con quiasmas.

Línea	Posición del sobrecruzamiento	Puente + fragmento	Frecuencia (%)
1R/1R <sub>inv</sub>			64/320 (20,0)
			2/320 (0,6)
1RL/1RL <sub>inv</sub>			92/317 (29,0)
			5/317 (1,6)
			31/317 (9,8)
			1/317 (0,3)
			10/317 (3,2)
			3/317 (0,9)
			5/317 (1,6)

**Figura 10.** Posición y frecuencia de los sobrecruzamientos que originaron cada tipo de configuración de puente y fragmento observado en anafase I en heterocigotos 1R/1R<sub>inv</sub> y 1RL/1RL<sub>inv</sub>.



**Figura 11.** Configuración de puente + fragmento formada por los cromosomas de centeno en anafase I en heterocigotos  $1R/1R_{inv}$  y  $1RL/1RL_{inv}$ . Los cromosomas de centeno fueron identificados con las sondas de ADN pUCM600 (rojo), pAWRC.1 (rojo) y pSc74 (verde) (A, C, E, G). Los cromosomas de trigo fueron teñidos con DAPI (B, D, F, H). A-B) Puente y fragmento formados después de un sobrecruzamiento entre los brazos largos de 1R y  $1R_{inv}$ . C-D) Puente y fragmento con tres señales en verde formados por los telocéntricos 1RL y  $1RL_{inv}$  después de un sobrecruzamiento entre el centrómero y el cromómero heterocromático proximal de  $1RL_{inv}$ . E-F) Puente y fragmento con dos señales en verde formados después de un sobrecruzamiento flanqueado por los cromómeros proximal y distal de  $1RL_{inv}$ . G, H) Dos puentes y dos fragmentos originados después de dos sobrecruzamientos complementarios ubicados a ambos lados del cromómero proximal de  $1RL_{inv}$ . La barra representa 10  $\mu m$ .

La configuración anafásica puente + fragmento acéntrico no proporcionó información sobre la situación del sobrecruzamiento en el heterocigoto de cromosomas completos  $1R/1R_{inv}$ . El número y posición de los cromómeros en tales estructuras no variaba con el cambio de posición del sobrecruzamiento (Figura 10, Figura 11A, B). La escasez de CMPs en AI con dos puentes y dos fragmentos denota una frecuencia muy baja de los dobles sobrecruzamientos complementarios (de cuatro cromátidas) en los heterocigotos  $1R/1R_{inv}$ . Sin embargo, la heterocigosis para el marcador subdistal de la planta  $1RL/1RL_{inv}$  ofreció la oportunidad de poder identificar el sitio donde se daba el sobrecruzamiento, en el segmento comprendido entre el centrómero y el cromómero proximal del brazo invertido o fuera de este segmento. El número y posición de los cromómeros en los puentes y fragmentos acéntricos en AI es diferente dependiendo de la posición del sobrecruzamiento (Figura 10). Un sobrecruzamiento entre el centrómero y el cromómero proximal da lugar a un

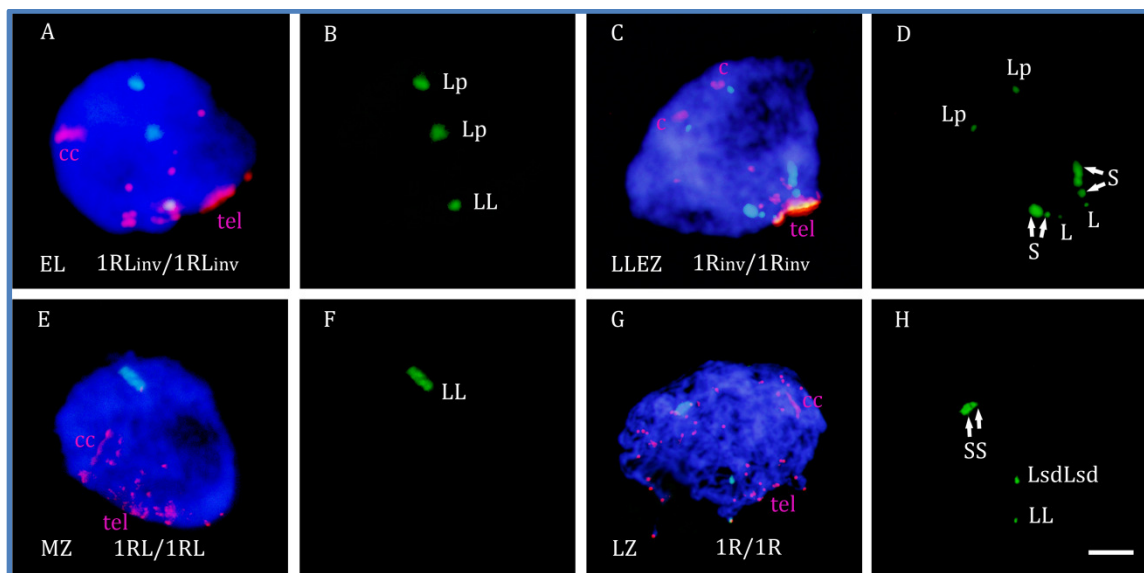
fragmento de tres señales (Figura 11C, D), mientras que un sobrecruzamiento fuera de este segmento da lugar a un fragmento con dos señales (Figura 11E, F). El tamaño de los fragmentos es igual a la longitud del brazo 1RL, independientemente de la posición del sobrecruzamiento. Dos sobrecruzamientos complementarios producidos en el mismo lado del cromómero proximal generan dos puentes y dos fragmentos acéntricos con los patrones de marcaje indicados anteriormente (Figura 11G, H). Los dobles sobrecruzamientos diagonales (de tres cromátidas) ubicados en el mismo lado del cromómero proximal no pudieron ser identificados, ya que producen el mismo resultado en AI que un solo sobrecruzamiento. Los dobles sobrecruzamientos recíprocos (de dos cromátidas), no pudieron ser detectados, ya que ellos no producen puente y fragmento en AI. Los sobrecruzamientos dobles complementarios y diagonales situados a ambos lados del cromómero proximal produjeron un marcado característico de los puentes + fragmentos que permitió que fueran también detectados (Figura 10).

La frecuencia de sobrecruzamientos en el segmento entre el centrómero y el cromómero proximal fue de un 36,3% y de un 15,8% en el resto del cromosoma. Esto significa que el 70% de todos los sobrecruzamientos formados en el brazo estuvieron localizados en un segmento muy corto del mismo situado entre el centrómero y el cromómero proximal del cromosoma invertido. La contraparte homóloga de este segmento se sitúa en la región distal del cromosoma estándar. El tamaño de este segmento representa el 10% de la longitud del brazo 1RL en paquitena. El resto de los sobrecruzamientos lo más probable es que ocurran en la cercanía de este segmento, tal como se deduce de las uniones en posición proximal de MI.

### **2.3.-Dinámica del centrómero y marcador distal en profase I temprana y media**

Para establecer el papel que desempeñan las regiones distal y proximal del brazo cromosómico en el reconocimiento homólogo, apareamiento y sinapsis, hemos analizado la dinámica de los cromómeros heterocromáticos y de los centrómeros del par de cromosomas de centeno en meiocitos en estadios comprendidos desde leptotena temprana hasta paquitena. Los estadios en que estaban los meiocitos fueron inferidos de la disposición espacial de los telómeros

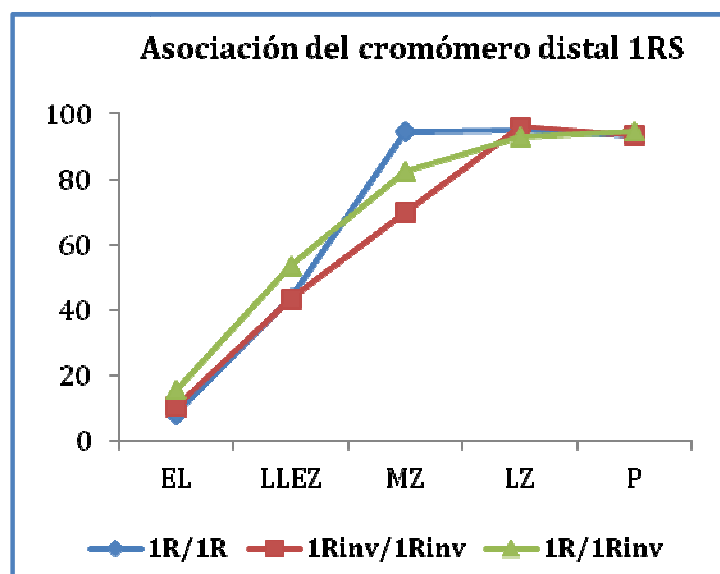
(Figura 12, 13). Como ya se ha indicado anteriormente en leptotena los telómeros migran para formar un apretado agrupamiento y los centrómeros aparecen como estructuras compactas ubicadas en el polo opuesto del núcleo. Además, la cromatina experimenta un cambio conformacional que produce la elongación del cromosoma (Maestra et al., 2002). Esta elongación puede percibirse en las señales de los centrómeros durante la transición leptotena-cigotena. El bouquet se consolida en la transición leptotena-cigotena y se desorganiza en cigotena media. En etapas postbouquet, cigotena tardía y paquitena la cromatina se diferencia por su grado de condensación. El cambio de la conformación de la cromatina producido en leptotena provocó que los cromómeros subteloméricos de 1RS (Figura 8) se subdividieran en dos, que de nuevo volvían a juntarse en cigotena tardía (Figura 12D, H).



**Figura 12.** Disposición de telómeros (tel), centrómeros (c) y cromómeros heterocromáticos en estados de profase I temprana y media en diferentes combinaciones de cromosomas de centeno. Los cromómeros distales de 1RS y 1RL se denominaron S y L, respectivamente, Lsd se utilizó para nombrar el cromómero subdistal del brazo largo del cromosoma 1RL, y Lp para el cromómero proximal de 1RL<sub>inv</sub>. A-B) Célula en leptotena temprana (EL) con varios grupos de telómeros, asociación de centrómeros y cromómeros distales de 1RL<sub>inv</sub>, y separación de los cromómeros proximales. Las señales de los centrómeros son más largas que en cualquiera de las señales teloméricas localizadas en el hemisferio opuesto. C-D) Células en transición leptotena-cigotena (LLEZ) mostrando una disposición bipolar de los grupos de centrómeros y telómeros que denota la formación del bouquet. Tanto los centrómeros como los cromómeros heterocromáticos están separados. El marcador S aparece dividido en dos subcromómeros desiguales (flechas) debido a la elongación cromosómica. E-F) Células en cigotena media (MZ) con el bouquet parcialmente desorganizado. Los centrómeros y cromómeros distales están asociados. G-H) Células en cigotena tardía (LZ) con el bouquet desorganizado. Los subcromómeros 1RS (flechas) están unidos debido a la condensación de la cromatina; todos los marcadores están asociados. La barra representa 10  $\mu$ m.

El análisis de la dinámica de los cromómeros y centrómeros homólogos en el curso de la profase I estuvo basado en la variación de su posición relativa. Se consideraron dos tipos de posición para las estructuras homólogas: ausencia de asociación física y asociación estrecha. Los marcadores homólogos visualizados por FISH como dos señales localizadas a una distancia física mayor a 1µm fueron considerados como no asociados. Los marcadores fueron contabilizados como asociados cuando las dos señales se fusionaron en una sola, o cuando se observaron dos señales muy próximas entre sí. Ejemplos de marcadores asociados y no asociados se pueden ver en la Figura 12.

El marcador distal del brazo 1RS, que no estaba involucrado en la inversión, se comportó del mismo modo en las tres plantas estudiadas. Su frecuencia de asociación fue relativamente baja durante leptotena temprana, pero se incrementó en la transición leptotena cigotena, con la formación del bouquet de télómeros y especialmente con el avance de la sinapsis durante cigotena, alcanzando frecuencias cercanas al 100% en paquitena (Figura 13).



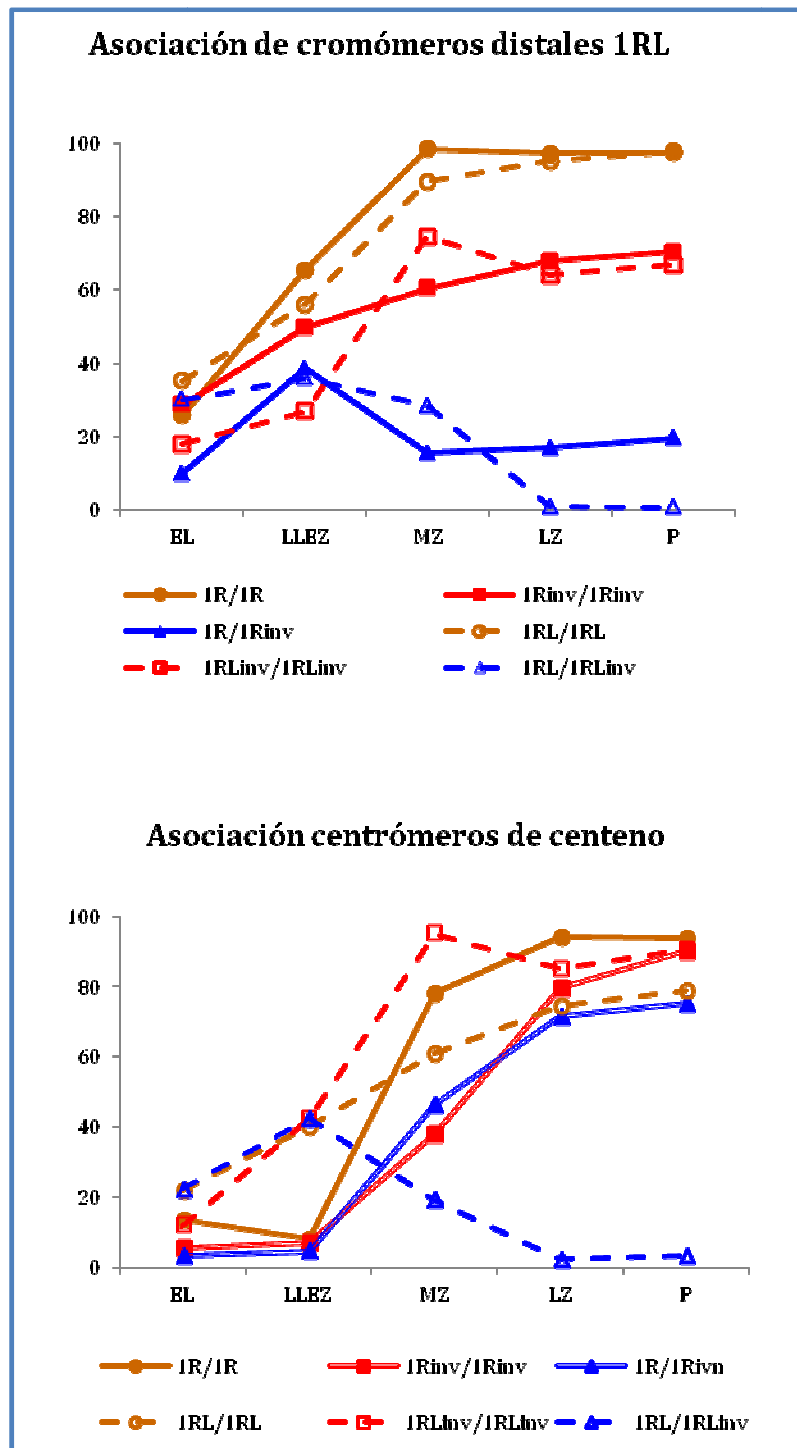
**Figura 13.** Frecuencia de asociación (%) del par de cromómeros distal 1RS en profase I temprana y media en plantas 1R/1R, 1R<sub>inv</sub>/1R<sub>inv</sub> y 1R/1R<sub>inv</sub>. EL (leptotena temprana), LLEZ (transición leptotena-cigotena), MZ (cigotena media), LZ (cigotena tardía), P (paquitena). Media de CMPs= 181 ± 32.

El comportamiento del marcador distal de 1RL fue afectado por la inversión (Figura 14). La frecuencia de asociación del cromómero distal de 1RL en los homocigotos para los brazos estándar (1R/1R y 1RL/1RL), se incrementó con la consolidación del bouquet y con la progresión de la sinapsis, alcanzado valores



cercanos al 100% en paquitenia. Sin embargo, en los homocigotos para la inversión hubo una frecuencia de asociación por debajo del 70% en paquitenia, incluso se observó una reducción en la frecuencia de asociación después de cigotena media en homocigotos ditelocéntricos  $1RL_{inv}/1RL_{inv}$ . Este comportamiento sugiere que la sinapsis falló en la región distal pobre en sobrecruzamientos del brazo largo del cromosoma  $1RL_{inv}$ . En los heterocigotos, el aumento de la frecuencia de asociación del cromómero distal de  $1RL$  producido con la formación del bouquet durante la transición leptotena-cigotena, fue seguido de una reducción y casi desaparición completa de las asociaciones iniciales durante el desarrollo de la sinapsis en los ditelocéntricos heterocigotos  $1RL/1RL_{inv}$ .

El comportamiento de los centrómeros en todas las líneas también está ilustrado en la Figura 14. Las asociaciones durante la transición leptotena-cigotena aumentaron notablemente en todas las líneas ditelocéntricas, sin embargo, en las líneas con cromosomas de dos brazos no hay asociación. Los centrómeros de los cromosomas telocéntricos migran al polo telomérico arrastrados por sus telómeros durante la formación del bouquet. Por tanto, sus centrómeros tienen más oportunidades de reunirse que los de los cromosomas con dos brazos, que se mantienen en el polo centromérico. En los homocigotos ditelocéntricos los niveles de asociación centromérica se incrementaron con el avance de la sinapsis, pero los homocigotos para la inversión alcanzaron niveles de asociación más altos que los homocigotos normales. Este resultado indica que, el comportamiento de los centrómeros cambia con la proximidad de la región rica en sobrecruzamientos. En contraste, con los homocigotos, la mayoría de asociaciones presentes en el estadio de bouquet, en heterocigotos  $1RL/1RL_{inv}$ , desaparecieron en cigotena. El marcador centromérico y el marcador distal se comportaron de la misma forma en los heterocigotos ditelocéntricos. En cambio, la presencia del brazo corto en los cromosomas con dos brazos condicionó el comportamiento de su centrómero. En los homocigotos la frecuencia final de asociación centromérica fue superior al 90% y cercana al 80% en los heterocigotos. No obstante, hubo un retraso en la asociación de los centrómeros de los cromosomas invertidos respecto a los del cromosoma estándar.

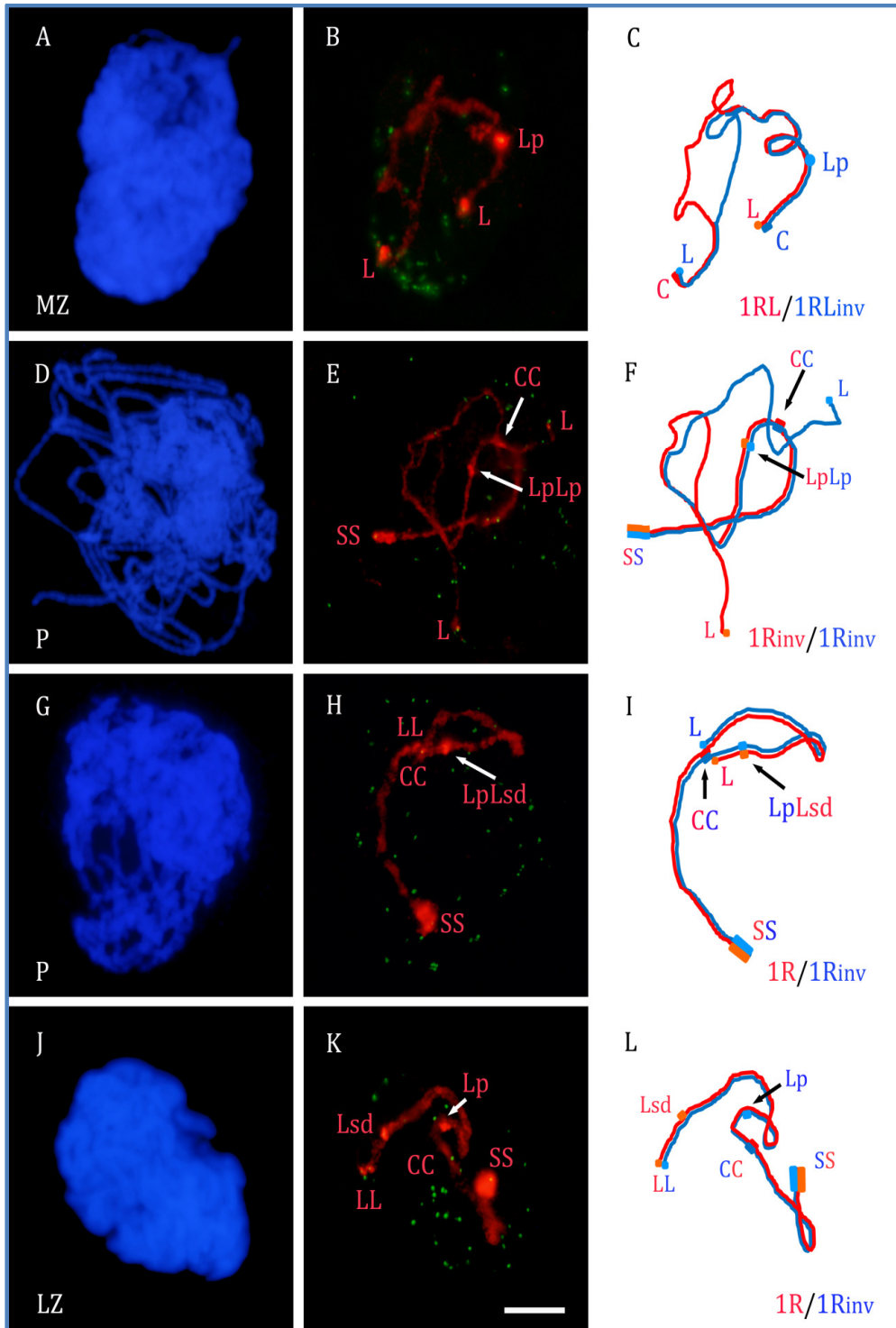


**Figura 14.** Frecuencia de asociación (%) de los cromómeros distales y centrómeros de 1RL en profase I temprana y media en las seis líneas trigo-centeno estudiadas. Media de CMPs=  $159 \pm 22$ .

## 2.4.-Desarrollo de la sinapsis en el par de cromosomas de centeno

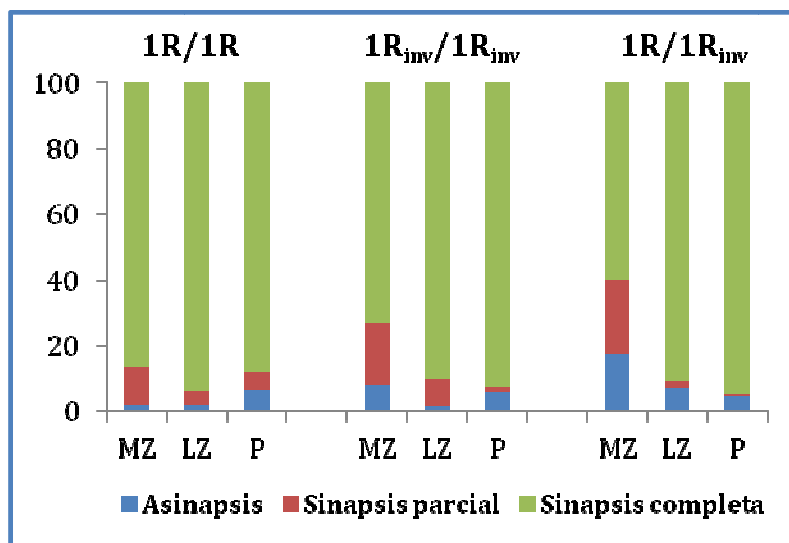
Para confirmar el efecto en el patrón sináptico de la inversión de la posición de las regiones cromosómicas ricas y pobres en sobrecruzamientos se efectuó una cuantificación de la progresión de la sinapsis en meiocitos que se encontraban en cigotena y paquitena. Las células estudiadas se agruparon en tres categorías: a)

CMPs con asinapsis (nivel de sinapsis = 0%), b) CMPs con sinapsis parcial (nivel de sinapsis < 90%) y c) CMPs con sinapsis completa (nivel de sinapsis > 90%). En la Figura 15 se pueden ver algunos ejemplos.



**Figura 15.** La configuración sináptica del par de cromosomas de centeno en células en cigotena media (MZ), cigotena tardía (LZ) y paquitena (P) en diferentes líneas. A, D, G, J) Imagen de DAPI de cada núcleo. B, E, H, K) Disposición de los telómeros marcados con la sonda pAt74 (verde) y los bivalentes de centeno hibridados con las sondas pUCM600, pAWRC.1, y pSc74 (rojo) presentes en cada núcleo. C, F, I, L) Representación esquemática de los dos homólogos de centeno que intervienen en cada bivalente. B, C) los telocéntricos 1RL y 1RL<sub>inv</sub> muestran disposición antiparalela y sinapsis en ambos extremos. E, F) Sinapsis del par 1R<sub>inv</sub>-1R<sub>inv</sub> que abarca el brazo 1RS y la región proximal de 1RL<sub>inv</sub> incluyendo el cromómero proximal. H, I) Cromosomas 1R y 1R<sub>inv</sub> mostrando sinapsis homóloga completa. K, L) Cromosomas 1R y 1R<sub>inv</sub> mostrando sinapsis homóloga del brazo corto y sinapsis no homóloga del brazo largo. La barra representa 10  $\mu$ m.

La distinción en la clasificación de los meiocitos se realizó tanto para el brazo corto como para el largo. Solo se consideraron los estadios de cigotena media, cigotena tardía y paquitena, ya que los niveles de sinapsis en la transición leptotena-cigotena fueron muy bajos. El brazo corto 1RS completó la sinapsis en cigotena tardía en la mayoría de las CMPs de las tres líneas estudiadas, aunque la sinapsis total se alcanzó un poco antes en los homocigotos para el cromosoma normal que en las otras dos líneas (Figura 16).

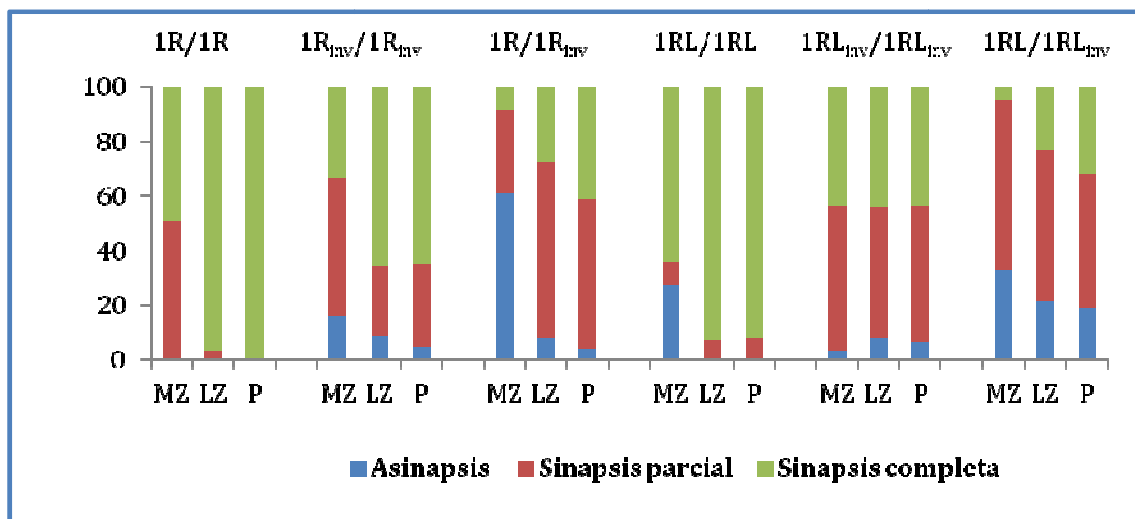


**Figura 16.** Frecuencia (%) de CMPs con asinapsis, sinapsis parcial o sinapsis completa del brazo 1RS en plantas 1R/1R, 1R<sub>inv</sub>/1R<sub>inv</sub> y 1R/1R<sub>inv</sub>. Media de CMPs= 126  $\pm$  20.

Los niveles de sinapsis del brazo 1RL en todas las líneas estudiadas se pueden ver en la Figura 17. Los homocigotos para el cromosoma normal (1R/1R y 1RL/1RL) completaron la sinapsis del brazo largo 1RL al final de cigotena en la mayoría de las CMPs. Sin embargo, el número de células con asinapsis en cigotena media sugiere que hubo un retraso en el inicio de la sinapsis en el homocigoto ditelocéntrico. En los homocigotos para la inversión se produjo una disminución de las CMPs con sinapsis completa. En los homocigotos para el cromosoma invertido

con dos brazos ( $1R_{inv}/1R_{inv}$ ) además, de observar CMPs con un cierto grado de asinapsis (5%-7%), el 31% de los meiocitos mostraron sinapsis parcial. En cambio, en los homocigotos ditelocéntricos ( $1RL_{inv}/1RL_{inv}$ ) la sinapsis parcial se observó con una frecuencia del 50%. Los patrones sinápticos indican que, en los homocigotos ditelocéntricos, la progresión de la sinapsis se detuvo antes que en los homocigotos para el cromosoma invertido con dos brazos. Los heterocigotos mostraron niveles más bajos de sinapsis que los homocigotos para la inversión. Solo, el 41% de CMPs en paquitena, en el heterocigoto con los dos brazos ( $1R/1R_{inv}$ ), y el 32% en el heterocigoto ditelocéntrico ( $1RL/1RL_{inv}$ ), completaron la sinapsis. Todas estas CMPs desarrollaron sinapsis homóloga en el heterocigoto ditelocéntrico. Entre las CMPs que completaron la sinapsis en paquitena en el heterocigoto para la inversión con cromosomas completos, solo el 55% de ellas desarrolló sinapsis homóloga (Figura 15H, I), y el 45% restante sinapsis no homóloga (Figura 15K, L).

En los homocigotos para la inversión se encontraron segmentos cromosómicos con sinapsis parcial, en las regiones en cuestión, ya sea proximal o distal, o ambas, pero con frecuencias diferentes (Tabla 9). El fallo en la sinapsis afectó principalmente a la zona pobre en sobrecruzamientos. En los heterocigotos, los segmentos cromosómicos proximal y distal de  $1RL$  y  $1RL_{inv}$ , se encontraron unidos en todas las combinaciones posibles, en CMPs con sinapsis parcial. Dichas combinaciones y los números de CMPs en que aparecían también se muestran en la Tabla 9. Las regiones proximal de  $1RL$  y  $1RL_{inv}$  estuvieron con relativa frecuencia apareadas en cigotena tardía y paquitena en el heterocigoto  $1R/1R_{inv}$ , probablemente por extensión de la sinapsis producida en el brazo corto. De hecho, en la mayoría de esos casos, la sinapsis cubría el brazo corto y la región del centrómero. Las regiones distales rara vez se encontraron asociadas. Entre las combinaciones proximal-distal, la sinapsis de la región proximal de  $1RL_{inv}$  y la región distal de  $1RL$  fue mucho más frecuente que la sinapsis de las regiones distal de  $1RL_{inv}$  y proximal de  $1RL$ . Estos resultados sugieren que la zona distal  $1RL$  y proximal  $1RL_{inv}$ , es decir, las regiones homólogas ricas en sobrecruzamientos, se encuentran unas a otras más fácilmente que otros segmentos pobres en sobrecruzamientos.



**Figura 17.** Frecuencia (%) de CMPs con asinapsis, sinapsis parcial o sinapsis completa del brazo 1RL en los seis tipos de plantas estudiadas. De entre las CMPs del heterocigoto 1R/1R<sub>inv</sub> con sinapsis completa, el 45% mostraron sinapsis no homóloga y el 55% sinapsis homóloga. Media de CMPs= 119 ± 16.

**Tabla 9.** Regiones apareadas en meiocitos con sinapsis parcial en cigotena media (MZ), cigotena tardía (LZ) y paquitena (P) en homocigotos y heterocigotos para la inversión. p= proximal; d= distal; n= 1RL; i= 1RL<sub>inv</sub>.

Línea	Estado	Regiones apareadas en homocigotos						Total CMPs
		pi-pi	di-di	pi-pi+ di-di				
1R/1R <sub>inv</sub>	MZ	41	25	20			138	
	LZ	41	2	0			126	
	P	35	7	0			107	
1RL <sub>inv</sub> /1RL <sub>inv</sub>	MZ	28	5	32			122	
	LZ	30	8	10			100	
	P	36	3	14			106	
	Regiones apareadas en heterocigotos							
		pn-pi	dn-di	pn-pi+ dn-di	pn-di	pi-dn	pn-di+ pi-dn	
	1R/1R <sub>inv</sub>	MZ	0	5	11	6	10	0
	LZ	62 <sup>a</sup>	0	5	0	31	0	153
	P	45 <sup>a</sup>	0	0	0	28	0	133
1RL/1RL <sub>inv</sub>	MZ	14	31	24	5	25	19	186
	LZ	3	3	2	0	60	1	125
	P	1	5	0	0	66	1	148

<sup>a</sup> Sinapsis que solo cubría la región del centrómero en el 74% de CMPs en MZ y en el 89% de CMPs en P.

### 3. Análisis de las líneas de translocación 1BS/1RS y 2BL/2RL

Lukaszewski et al., (2005) proporcionaron el mapa genético de las translocaciones 1BS/1RS y 2BL/2RL obtenidas mediante recombinación homeóloga. Aplicaron un protocolo de hibridación genómica *in situ* para distinguir los segmentos de trigo y de centeno de los cromosomas translocados, pero en algunos casos los segmentos translocados tenían un tamaño muy pequeño y no se apreciaban en los cromosomas en metafase mitótica.

Con el fin de realizar una medida del tamaño de los segmentos en todas las translocaciones, hicimos un estudio de las células en paquitena, en las que por la longitud que adquieren los cromosomas, todos los segmentos translocados podían visualizarse con el protocolo de FISH utilizado. De cada una de las plantas denominadas ROT se midieron entre tres y cinco células en las que la señal del material genético de centeno podía seguirse perfectamente en una proyección bidimensional. Se realizaron medidas de los brazos de centeno 1RS o 2RL y de los segmentos translocados de los brazos 1RS/1BS, 2RL/2BL o 2BL/2RL. Dichos valores aparecen en la Tabla 10. Las plantas ROT con translocaciones 1RS/1BS contenían además del cromosoma 1BL.1RS el cromosoma 1BL.1RS/1BS con un pequeño segmento de trigo translocado en el brazo de centeno. Este segmento aparecía de diferente color en los bivalentes en paquitena y su longitud y el valor que representa el total del brazo 1RS pudo ser establecido.

Las plantas denominadas PAT contenían el cromosoma de trigo 1BL.1BS junto con el cromosoma 1BL.1RS/1BS. En estas plantas solo estaba marcada la parte proximal de centeno del cromosoma 1BL.1RS/1BS. Su constitución así como las de las plantas ROT aparece en la Figura 18.

La longitud del brazo 1RS en las células medidas en paquitena fue de 27.21µm (Tabla 10). El tamaño de los segmentos translocados oscilaba entre valores que representaban entre el 12% y el 19% de dicho brazo. En todas ellas el punto de translocación se sitúa dentro del satélite del cromosoma 1R (Lukaszewski et al., 2005). Las translocaciones 2BL/2RL eran de dos tipos: uno en que un segmento terminal de 2BL se encontraba translocado al brazo 2RL (cromosoma 2BS.2RL/2BL) y otro en el que un segmento terminal 2RL estaba translocado al brazo 2BL (cromosoma 2BS.2BL/2RL). La constitución del par

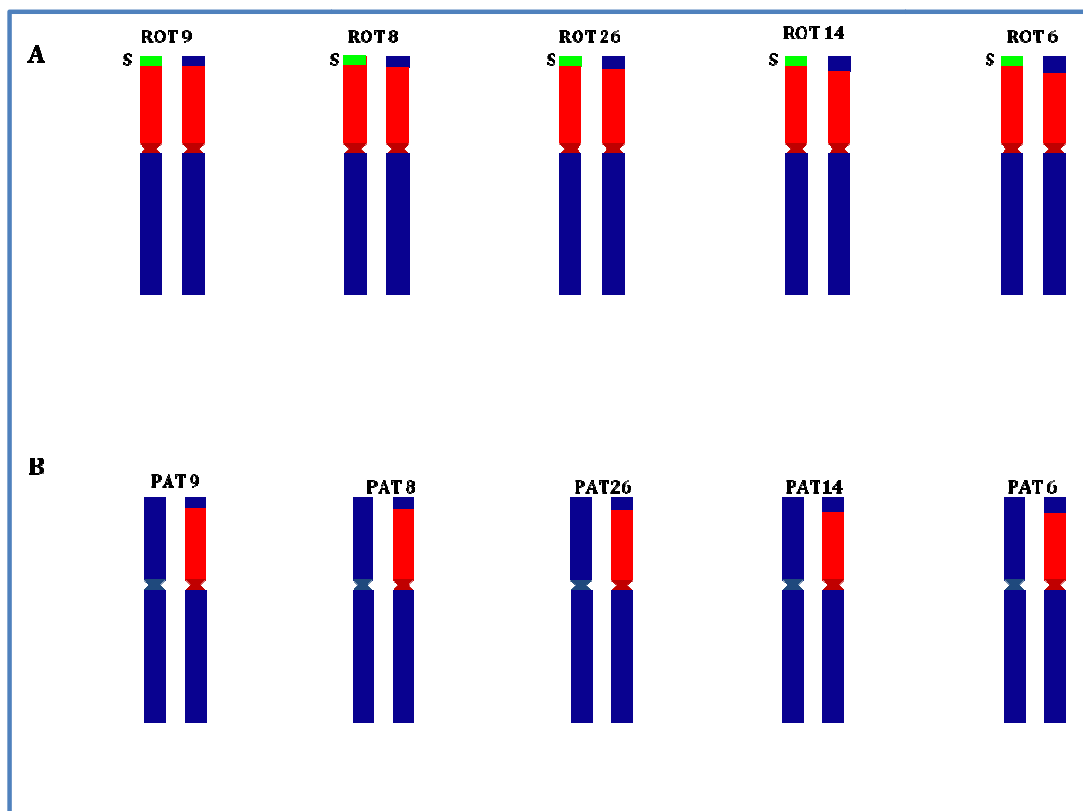
cromosómico 2B/2R en las plantas estudiadas se recoge en la Figura 19. Entre las plantas ROT se encuentran las que contienen el par cromosómico formado por 2BS.2RL y 2BS.2RL/2BL o por 2BS.2RL y 2BS.2BL/2RL.

Las plantas del tipo PAT también se agrupan en dos tipos: las que contienen el cromosoma 2BS.2BL junto con 2BS.2BL/2RL y los que tienen el cromosoma 2BS.2BL junto con 2BS.2RL/2BL. Al igual que para las translocaciones del grupo 1 de homeología se efectuó la medida del segmento translocado en paquitenia y se determinó a qué proporción del brazo 2RL intacto correspondía en las plantas ROT. Los resultados aparecen reflejados en la Tabla 10. El brazo 2RL tenía una longitud media de 64,81  $\mu\text{m}$  en las plantas analizadas. La longitud del segmento translocado tenía valores que oscilaban entre 2,6% y 11%. Para cada translocación se midieron entre 3 y 5 CMPs. El brazo 2RL en su extremo tiene dos cromómeros uno terminal y otro subterminal. Los puntos de translocación se situaban entre ambos cromómeros heterocromáticos en todos los cromosomas del tipo 2BS.2RL/2BL y en dos del tipo 2BS.2BL/2RL. Solo en la translocación denominada 2BL15 el segmento translocado del cromosoma 2BS.2BL/2RL incluía los dos cromómeros heterocromáticos.

**Tabla 10.** Longitud ( $\mu\text{m}$ ) en paquitenia de los brazos 1RS y 2RL de centeno y de los segmentos translocados en los brazos 1RS/1BS, 2RL/2BL y 2BL/2RL. (Entre paréntesis se indica el porcentaje del segmento translocado respecto al total del brazo).

BRAZO 1RS	Segmento translocado del brazo 1RS/1BS				
	ROT9	ROT8	ROT26	ROT14	ROT6
27,21 $\pm$ 1,57	3,27 $\pm$ 0,29 (12%)	3,63 $\pm$ 0,16 (13,3%)	3,92 $\pm$ 0,22 (14,4%)	4,71 $\pm$ 0,10 (17,3%)	5,19 $\pm$ 0,06 (18,7%)
BRAZO 2RL	Segmento translocado del brazo 2RL/2BL				
	ROT2RL2	ROT2RL12	ROT2RL10	ROT2RL19	
	1,69 $\pm$ 0,05 (2,6%)	2,16 $\pm$ 0,00 (3,3%)	4,27 $\pm$ 0,12 (6,6%)	6,80 $\pm$ 0,62 (10,5%)	
	Segmento translocado del brazo 2BL/2RL				
	ROT2BL12	ROT2BL19	ROT2BL15		
	3,10 $\pm$ 0,23 (4,8%)	4,36 $\pm$ 0,19 (6,7%)	7,19 $\pm$ 0,08 (11,1%)		

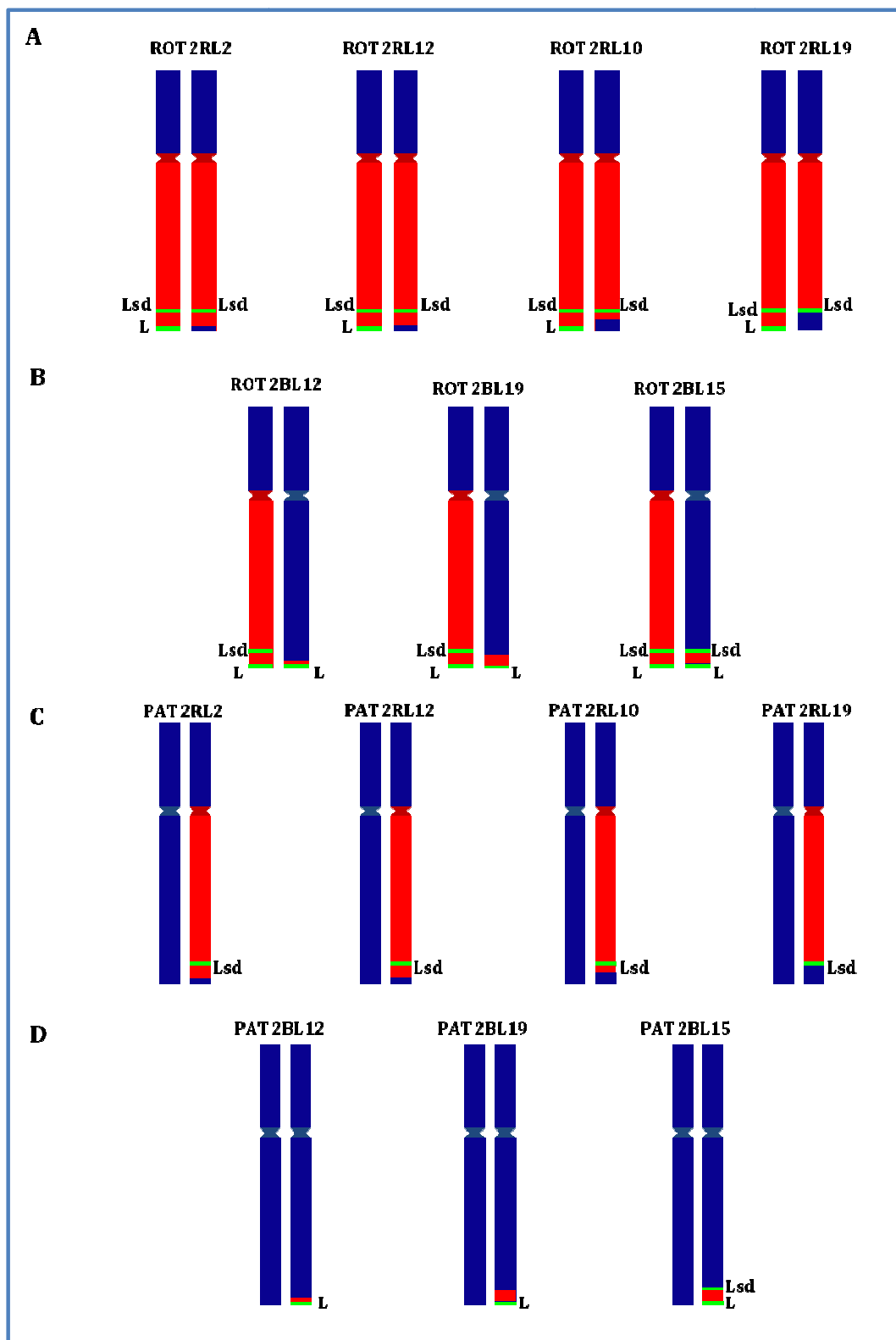




**Figura 18.** Esquema de la constitución cromosómica de las plantas ROT y PAT que implican a las translocaciones 1BS/1RS. A) Translocaciones ROT con los cromosomas 1BL.1RS y 1BL.1RS/1BS, representados en ese orden. B) Translocaciones PAT con los cromosomas 1BS.1BL y 1BL.1RS/1BS, representados en ese orden. En azul el cromosoma de trigo, en rojo el cromosoma de centeno y el verde indica el cromómero heterocromático distal del brazo 1RS (S).

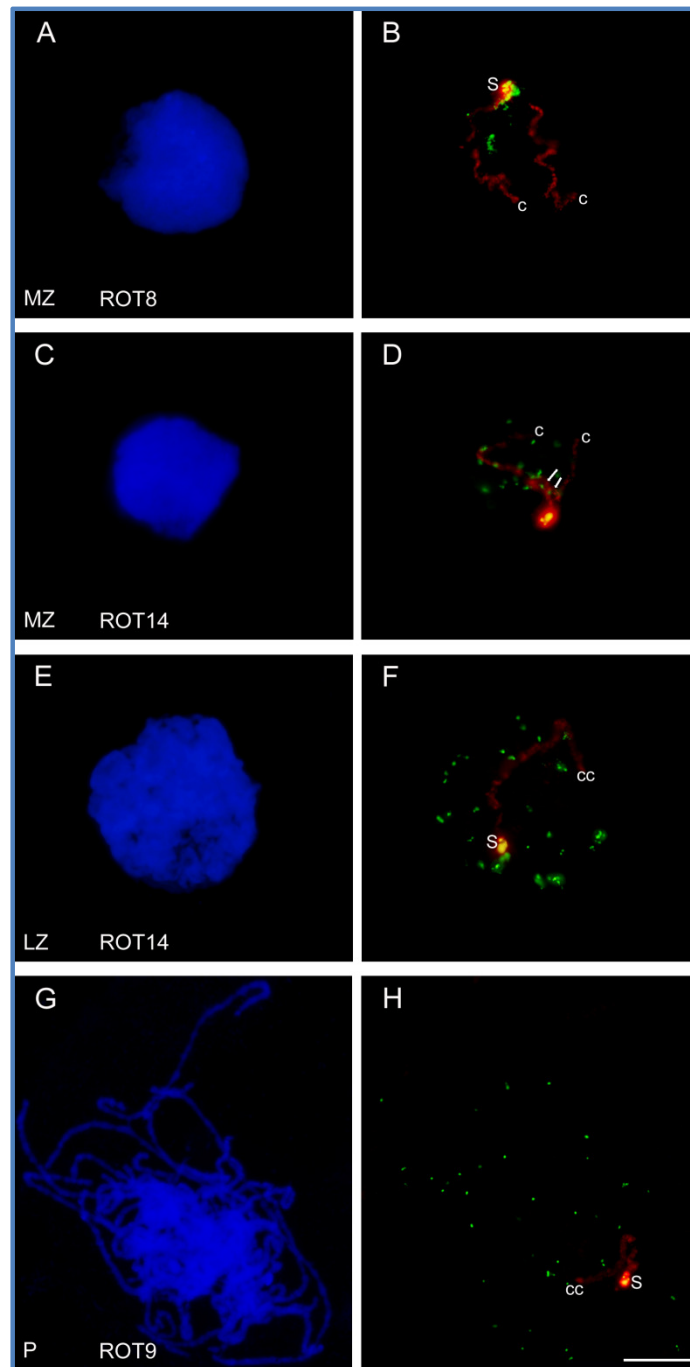
### 3.1.- Sinapsis y recombinación en las plantas con translocación 1RS/1BS

En las plantas ROT para las translocaciones 1RS/1BS fue posible distinguir mediante FISH los segmentos cromosómicos de centeno del cromosoma 1BL.1RS y del cromosoma 1BL.1RS/1BS y determinar si desarrollaban o no la sinapsis. Sin embargo, no podía detectarse en la mayoría de las CMPs si se producía o no sinapsis entre los segmentos homeólogos de trigo y centeno del brazo corto de ambos cromosomas. Debido a ello cuantificamos únicamente los valores de sinapsis entre segmentos homólogos de centeno.



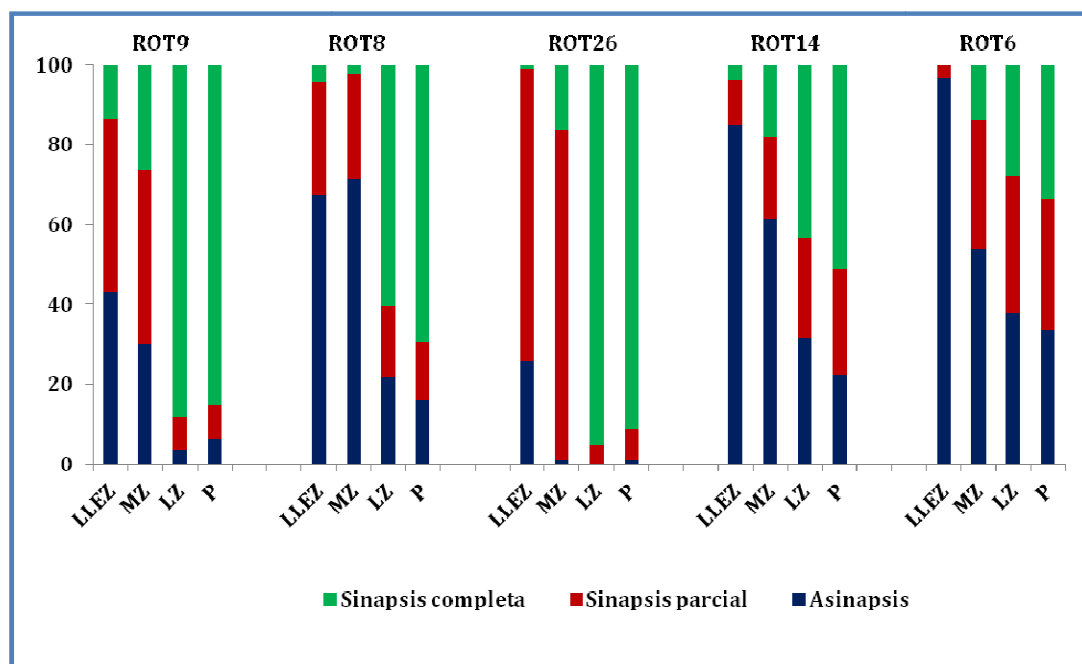
**Figura 19.** Esquema de la constitución cromosómica de las plantas ROT y PAT que implican a las translocaciones 2BL/2RL. A) Translocaciones ROT con los cromosomas 2BS.2RL y 2BS.2BL/2RL, representadas en ese orden. B) Translocaciones ROT con los cromosomas 2BS.2RL y 2BS.2BL/2RL, representadas en ese orden. C) Translocaciones PAT con los cromosomas 2BS.2BL y 2BS.2RL/2BL, representadas en ese orden. D) Translocaciones PAT con los cromosomas 2BS.2BL y 2BS.2BL/2RL, representadas en ese orden. En azul el cromosoma de trigo, en rojo el cromosoma de centeno y el verde indica los cromómeros heterocromáticos distal (L) y subdistal (Lsd) del brazo 2RL de centeno.

En la Figura 20 aparecen núcleos en distinto momento de la profase I con diferente grado de sinapsis. Para tener una idea general de cómo se desarrolla la sinapsis en las diferentes plantas hicimos una agrupación de los núcleos de cada una de las fases desde cigotena temprana hasta paquitena en tres categorías: núcleos con asinapsis de los segmentos homólogos de centeno, núcleos con sinapsis parcial, entre 1% y 90%, para dichos segmentos, y núcleos con sinapsis completa, sinapsis mayor del 90%.



**Figura 20.** Configuración sináptica del brazo corto del par de cromosomas 1R de centeno en células que se encuentran en cigotena media (MZ), cigotena tardía (LZ) y paquitena (P) en diferentes líneas. Disposición de los telómeros en distintas etapas de la profase I marcados con la sonda pAt74 (verde); el par de cromosomas de centeno fue hibridado con las sondas pUCM600, PAWRC.1, pSc74 (rojo). Los centrómeros están indicados con la letra c y la heterocromatina distal como S. A-C-E-G) Muestra el DAPI de cada núcleo presentado. A-B) Célula de ROT8 donde se aprecian los dos cromosomas homólogos completamente separados en cigotena media. C-D) CMP de ROT14 en cigotena media con 5% de sinapsis, las flechas indican los dos cromosomas después de separarse, sus centrómeros no están asociados. E-F) Célula de ROT14 en cigotena tardía cuyos cromosomas han completado la sinapsis. G-H) CMP de ROT9 que se encuentra en paquitena que muestra el par de cromosoma con sinapsis completa.

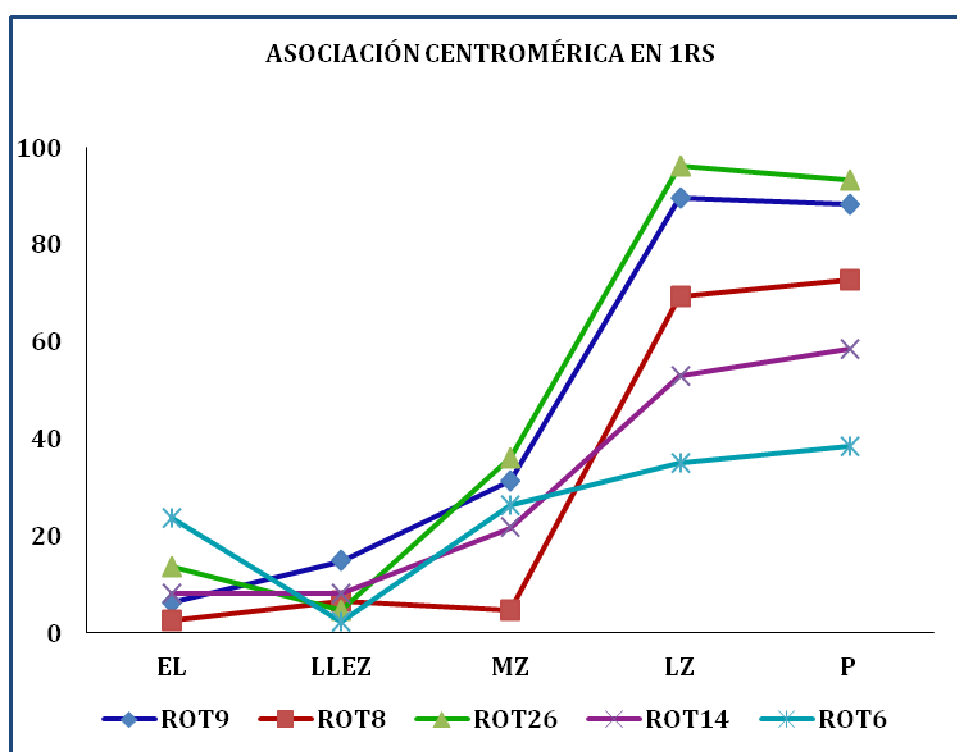
Los valores obtenidos para cada una de las plantas aparecen representados en la Figura 21. Hay un evidente descenso de la frecuencia de núcleos con sinapsis completa en las translocaciones ROT14 y ROT6 que son aquellas cuyo segmento translocado es mayor, lo que implica que las secuencias de centeno ausentes en esa región, sustituidas por material genético de trigo, son importantes para el reconocimiento de los homólogos y para que se produzca la iniciación y progreso de la sinapsis. En ausencia de homología en esas regiones se producen mayor número de fallos en el ensamblaje del complejo sinaptonémico.



**Figura 21.** Frecuencia (%) de CMPs con asinapsis, sinapsis parcial o sinapsis completa del brazo corto 1RS en las cinco líneas de translocación estudiadas. En todas las líneas la sinapsis falló en algunas CMPs durante paquitena. Número promedio de CMPs =  $88,45 \pm 1,72$

Llama la atención también que la translocación ROT26, situada en tercer lugar en el orden de tamaño, sea la que afecta en menor medida al desarrollo de la sinapsis. En esta translocación la sinapsis se completa con mayor rapidez y frecuencia que en las translocaciones ROT9 y ROT8 cuyo segmento translocado tiene menor tamaño.

El centrómero contiene secuencias específicas de centeno en ambos cromosomas y pudo ser detectado mediante FISH. Cuantificamos también la frecuencia de asociación en las distintas etapas de la profase I y los resultados obtenidos aparecen en la Figura 22. La frecuencia de asociación es acorde con la cantidad de núcleos con sinapsis completa en las distintas líneas.



**Figura 22.** Frecuencia (%) de asociación de centrómeros del brazo corto 1RS en profase temprana y media en las cinco líneas de translocación trigo-centeno estudiadas. Media de CMPs =  $88 \pm 11,50$ .

Respecto a la formación de quiasmas en el par cromosómico afectado por la translocación, hicimos una estimación de su frecuencia en función del número de veces que aparecían unidos sus brazos en MI. Los brazos 1BL homólogos aparecían unidos en todas las células estudiadas. El brazo 1RS y el brazo 1RS/1BS aparecían unidos con frecuencia variable dependiendo de la translocación. Los valores obtenidos se indican en la Tabla 11. Se muestran tanto los de las plantas ROT como los de las plantas PAT. La frecuencia de asociación es mayor en las plantas ROT con

translocaciones más pequeñas y, en cambio, en las PAT, es mayor en las que tienen fragmentos translocados más grandes. Esto nos está sugiriendo una diferente localización de los sobrecruzamientos en ambos tipos de plantas. Entre regiones homólogas de centeno y por tanto subterminales en las plantas ROT, y entre regiones homólogas de trigo y por tanto terminales en las plantas PAT.

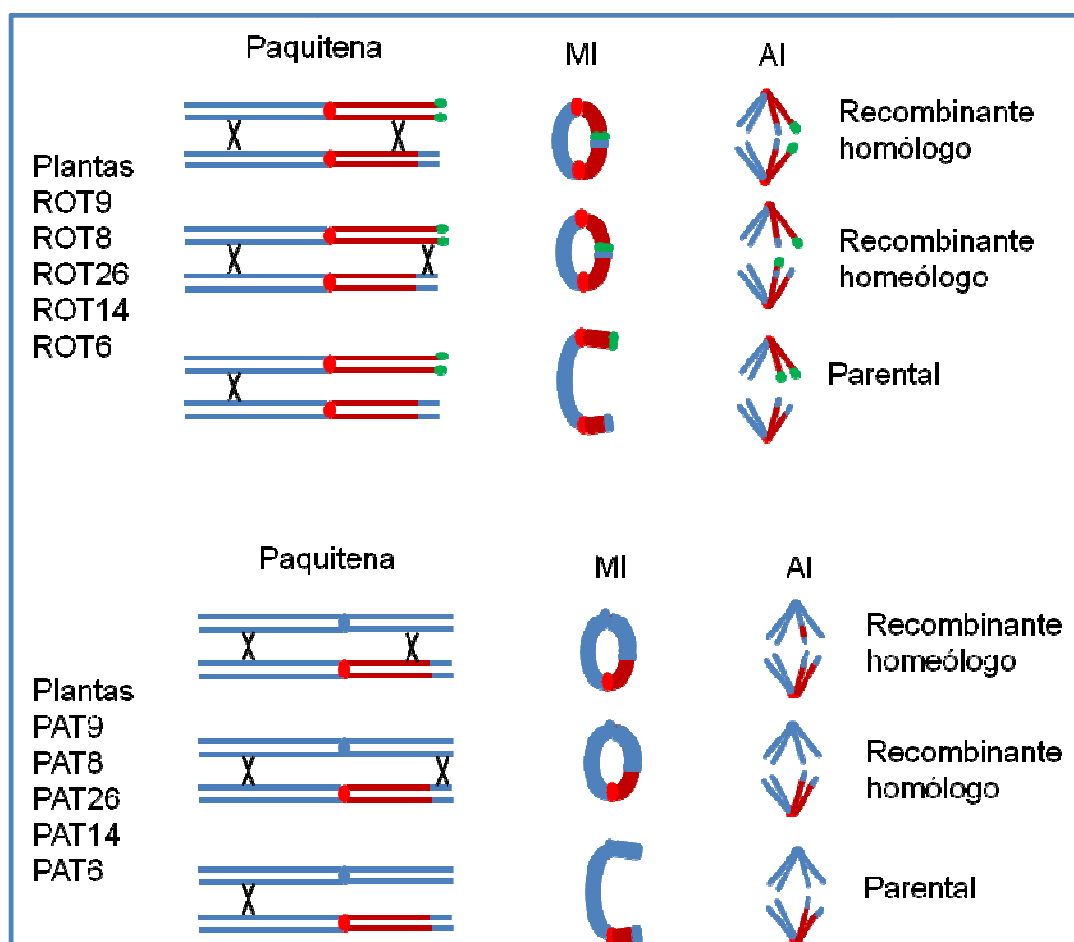
**Tabla 11.** Porcentaje de asociación en MI del brazo portador de translocación 1RS/1BS con el brazo 1RS en las plantas ROT, o con el brazo 1BS en las plantas PAT, y porcentaje (%) de recombinación detectada en AI. Entre paréntesis se indica el número de CMPs observadas en cada caso.

Tipo de plantas	Asociación en MI	CMPs	Recombinación detectada en AI	CMPs	$\chi^2$ de contingencia
ROT 9	62,7 (74)	118	53,4 (54)	101	1,89
ROT 8	48,6 (51)	105	48,6 (35)	72	0,00003
ROT 26	28,3 (30)	106	19,5 (16)	82	1,96
ROT 14	28,4 (29)	102	36,4 (32)	88	1,33
ROT 6	35 (28)	80	23,8 (21)	88	7,39 *
PAT 9	50	100	0	101	67,09***
PAT 8	47,7	107	0	100	63,06***
PAT 26	70,8	113	0	114	91,29***
PAT 14	69,2	104	0	108	113,35***
PAT 6	71,8	103	0	108	119,65***

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Los posibles lugares en los que se puede dar el SC en ambos tipos de plantas y el tipo de cromosomas que se formarían en AI aparecen indicados en la Figura 23. Se muestran algunos ejemplos de estas CMPs en la Figura 24. En ausencia de sobrecruzamiento en el brazo corto, se producen bivalentes abiertos en MI y cromosomas con la constitución parental en AI. La presencia de un sobrecruzamiento en la región homóloga del brazo corto da lugar a cromosomas

recombinantes distintos de los parentales en las plantas ROT e iguales a los parentales en las plantas PAT. De producirse un sobrecruzamiento en las regiones homeólogas aparecerían cromosomas recombinantes con un marcaje distinto de los indicados anteriormente.

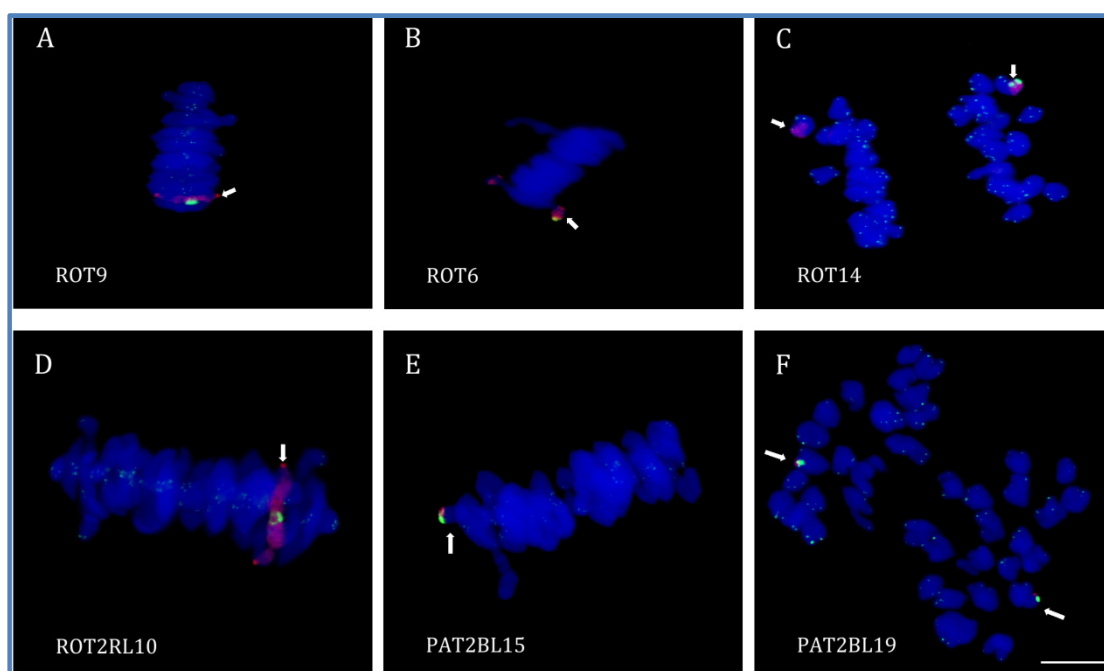


**Figura 23.** Bivalentes en MI y cromosomas en AI formados por los pares cromosómicos 1BL.1RS y 1BL.1RS/1BS en las plantas ROT, o 1BL.1BS y 1BL.1RS/1BS en las plantas PAT, en función de la posición y número de quiasmas formados en paquitena. En azul se representa el material genético de trigo y en rojo y verde el de centeno.

Tales cromosomas recombinantes no fueron observados y, por tanto, no se produjo recombinación homeóloga trigo-centeno. Este resultado se explica por la presencia del gen *Ph1* que suprime la recombinación homeóloga.

La frecuencia de recombinación detectada en AI en las plantas ROT se corresponde bastante bien con la frecuencia de asociación en MI, excepto en la planta ROT6 donde aparece un exceso de asociaciones en MI (Tabla 11). Esta desviación puede ser fruto del muestreo o debido a diferencias entre anteras provocadas por el ambiente. No parece probable que se deba a una acumulación de

dobles sobrecruzamientos recíprocos ya que en otras plantas con mayor frecuencia de sobrecruzamiento no se observa.



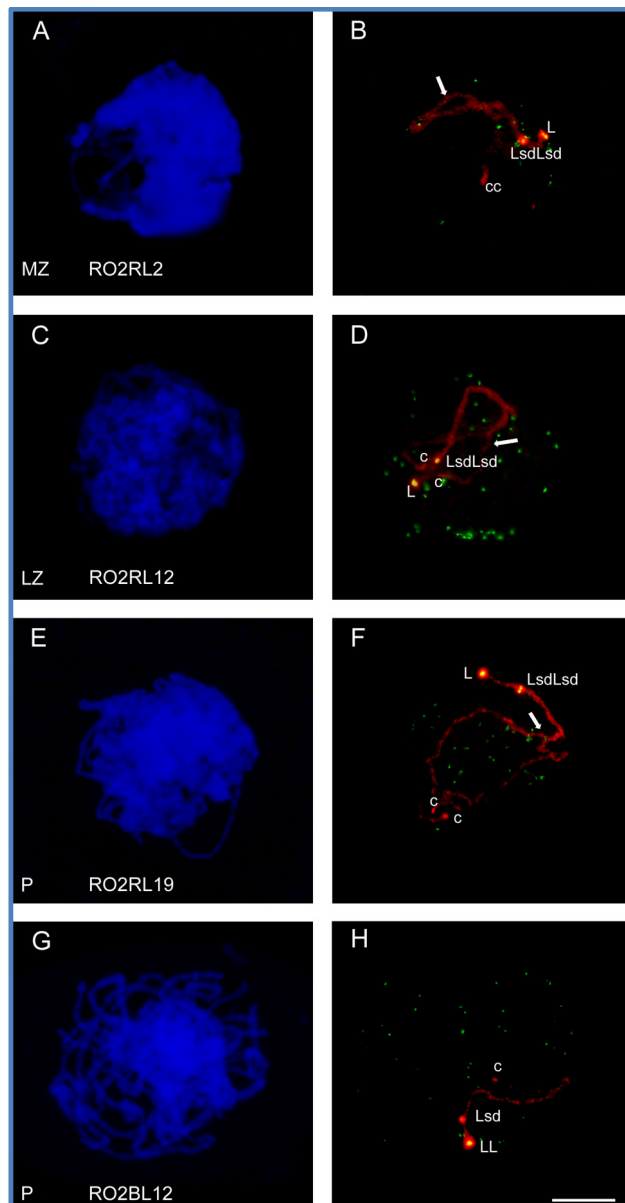
**Figura 24.** Meiocitos en MI y cromosomas en AI formados por los pares cromosómicos 1BL.1RS y 1BL.1RS/1BS, 2BS.2RL y 2BS.2RL/2BL en las plantas ROT, o 2BS.2BL y 2BS.2BL/2RL en las plantas PAT. Los cromosomas de centeno fueron identificados por FISH con sondas específicas de ADN, pSc74 (verde), pAWRC.1 (rojo intenso), UCM600 (rojo), pAt74 (verde) para todos los telómeros A) Bivalente cerrado (flecha) B) Bivalente abierto (flecha) C) AI mostrando cromosomas con la constitución de tipo parental (flechas). D) Bivalente cerrado en metafase I (flecha) E) Bivalente abierto en MI F) AI mostrando dos cromosomas recombinantes (flechas). La barra equivale a 10  $\mu$ m.

En las plantas PAT no pudo detectarse la presencia de cromosomas recombinantes producidos por recombinación homóloga, ya que presentaban el mismo marcaje que los parentales. Esto explica que al comparar los resultados de MI y AI se encuentren diferencias altamente significativas en todos los casos (Tabla 11). La frecuencia de asociación en MI presenta valores en torno al 70% en las plantas PAT26, PAT14 y PAT6 con los segmentos translocados mayores, y cercanos al 50% en las plantas PAT8 y PAT9 con los segmentos translocados más cortos. Este resultado sugiere que la probabilidad de sobrecruzamiento en el 12% terminal del brazo 1BS se sitúa en torno al 50% y aumenta al 70% al extenderse el segmento considerado hasta el 19% de la longitud del brazo.



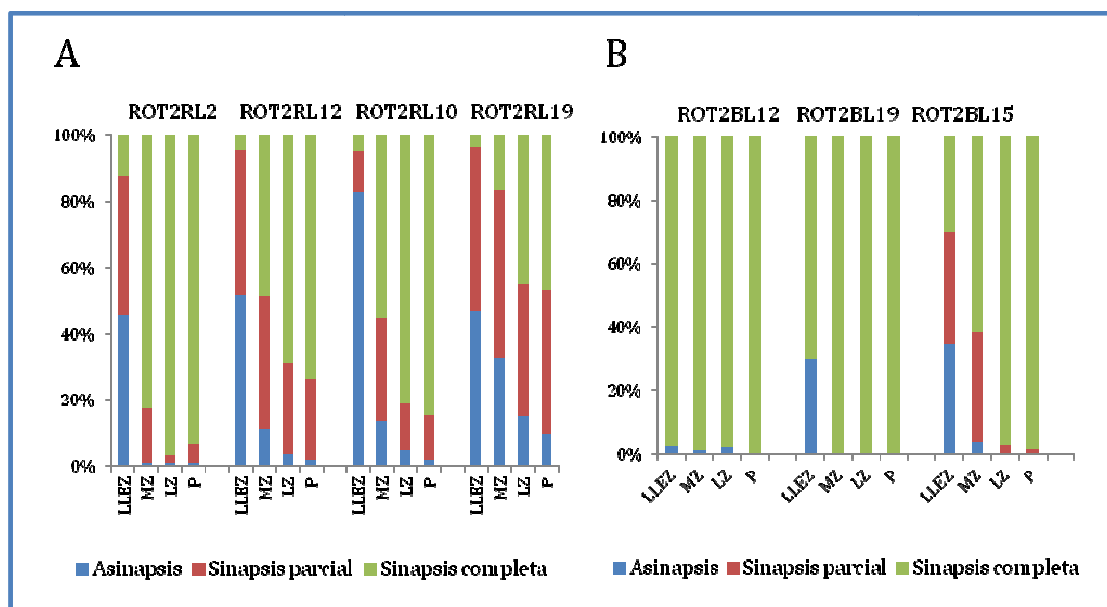
### 3.2.- Sinapsis y recombinación en las plantas con translocaciones 2RL/2BL

Al igual que sucedía con las translocaciones del grupo de homeología 1 también fue posible distinguir mediante FISH los segmentos cromosómicos de centeno y de trigo en las plantas con translocaciones 2RL/2BL. En las plantas de tipo ROT pudo verificarse si se producía o no sinapsis entre segmentos homólogos de centeno. Esos segmentos homólogos ocupan posiciones entre proximales y subdistales en las plantas ROT2RL2, ROT2RL12, ROT2RL10 y ROT2RL19, y posiciones distales en las plantas ROT2BL12, ROT2BL19 y ROT2BL15. En la Figura 25 se muestran algunos ejemplos de meiocitos con diferente grado de sinapsis en profase I de dichas plantas.



**Figura 25.** Configuración sináptica del brazo largo 2RL de centeno en células que se encuentran en cigotena media (MZ), cigotena tardía (LZ) y paquitena (P) en diferentes líneas. Disposición de los telómeros en distintas etapas de la profase I marcados con la sonda pAt74 (verde); el par de cromosomas de centeno fue hibridado con las sondas pUCM600, PAWRC.1, pSc74 (rojo). Los centrómeros están indicados con la letra c, la heterocromatina distal como L y la subdistal como Lsd. A-C-E-G) Muestra el DAPI de cada núcleo presentado. A-B) Célula de ROT2RL2 en cigotena media, con sinapsis parcial, sus centrómeros y heterocromatina subdistal están asociados, la flecha indica donde se han separado. C-D) CMP de ROT2RL12 en cigotena tardía con sinapsis parcial, los centrómeros están separados y los cromómeros subdistales asociados, la flecha está indicando el lugar del cromosoma donde no hay sinapsis. E-F) Célula de ROT2RL19 en paquitena con sinapsis incompleta, se observan sus cromómeros subdistales asociados y el punto en el cual se han separado está indicado con la flecha. G-H) CMP de ROT2BL12 en paquitena con la sinapsis completa en la zona homóloga.

La cuantificación de la sinapsis en las distintas etapas de la profase I se realizó considerando los tipos de CMPs con asinapsis, sinapsis parcial o sinapsis completa descritos en un apartado anterior. Los valores de sinapsis obtenidos aparecen representados en los gráficos de la Figura 26. El Gráfico 26A concierne a las plantas cuyo brazo cromosómico translocado era de centeno, en su parte proximal-subdistal y de trigo en su región distal. Los fallos en la sinapsis aumentan a medida que disminuye el tamaño de la región de centeno homóloga. Es decir, la probabilidad de interacción y sinapsis de las regiones homólogas desciende a medida que se alejan del extremo cromosómico.

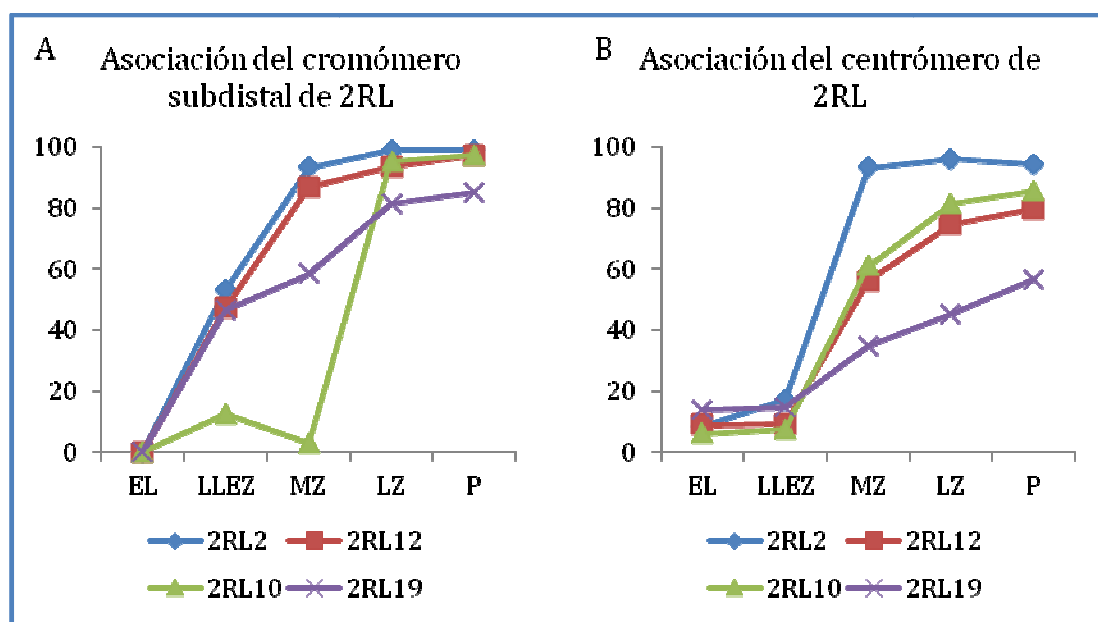


**Figura 26.** Cuantificación de la sinapsis entre segmentos homólogos de centeno en plantas con translocaciones 2RL/2BL. A) Plantas ROT con segmentos homólogos de centeno proximales-subdistales. B) Plantas ROT con segmentos homólogos de centeno distales.

El gráfico 26B muestra el desarrollo de la sinapsis entre segmentos distales de centeno. Apenas se producen fallos en la sinapsis, los segmentos homólogos

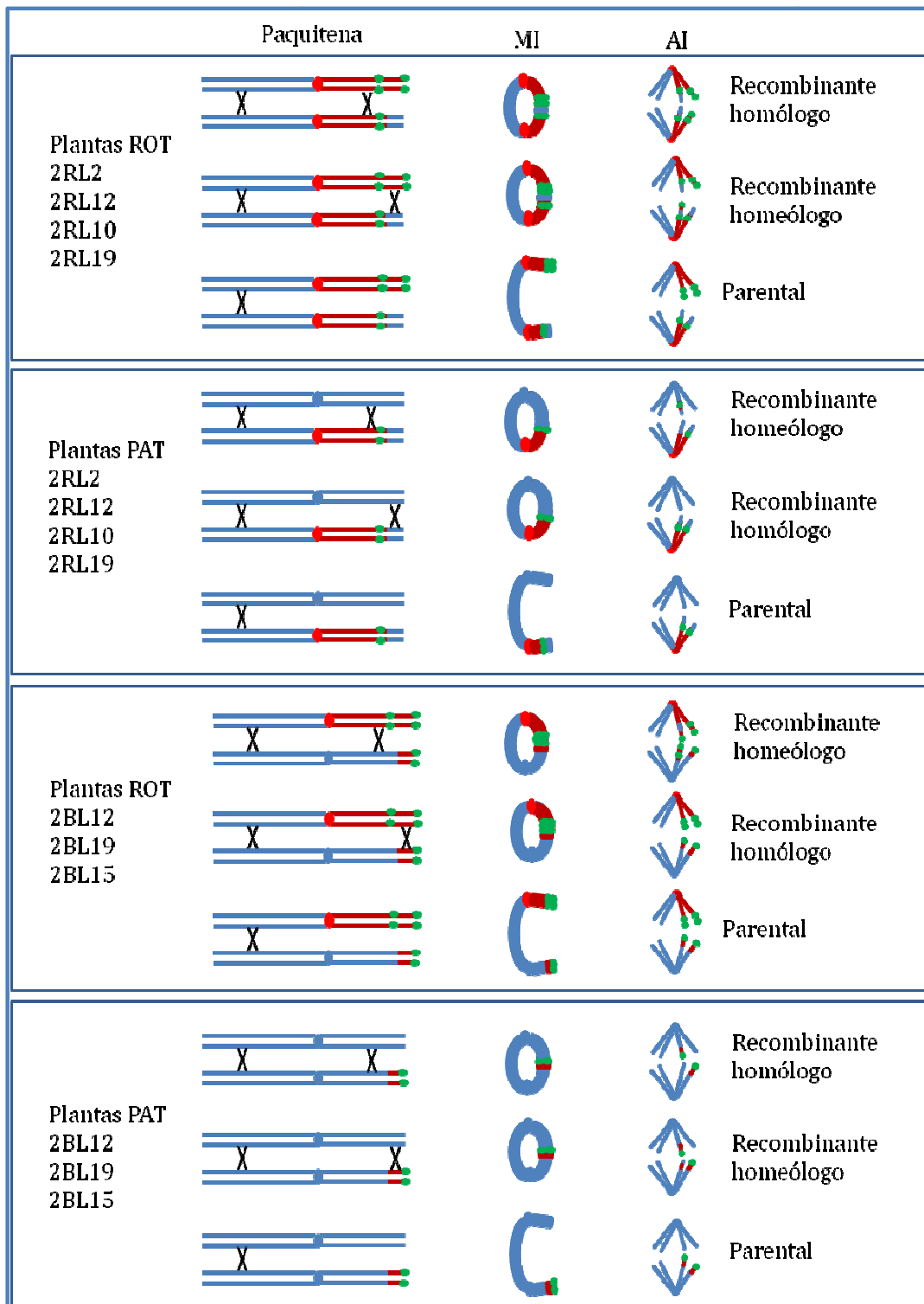
logran establecer sinapsis en todas las células. En las plantas ROT2BL19 y ROT2BL15 tardan más en completar la sinapsis dado que el tamaño del segmento homólogo de centeno es mayor que el de ROT2BL12. Por la misma razón ROT2BL19 completa la sinapsis antes que ROT2BL15.

En las plantas ROT2RL2, ROT2RL12, ROT2RL10, ROT2RL19 se pudieron identificar también mediante FISH, el par de cromómeros heterocromáticos subdistales presentes en todas ella, así como el par de centrómeros con material genético de centeno. la frecuencia con la que estos dos marcadores aparecían asociados en el transcurso de la sinapsis se muestra en los gráficos de la Figura 27. El cromómero subdistal alcanza niveles de asociación algo mayores que el centrómero, especialmente en la plata 2RL19 que es donde más fallos se producen en la sinapsis. Este resultado está de acuerdo con una progresión de la sinapsis desde los extremos hacia el centro del cromosoma.



**Figura 27.** Frecuencia de asociación de marcadores homólogos de centeno en plantas con el par cromosómico 2BS.2RL y 2BS.2RL/2BL. A) Cromómero heterocromático subdistal del brazo 2RL. B) Centrómero de 2RL.

En lo que concierne a la formación de quiasmas la Figura 28 muestra los tipos de bivalentes esperados en MI y las parejas de cromosomas segregando en AI en función de la ocurrencia o no de sobrecruzamiento, y su posición, en el brazo con la translocación. Algunos ejemplos de CMPs se muestran en la Figura 24.



**Figura 28.** Bivalentes en MI y cromosomas en AI formados por los pares cromosómicos 2BS.2RL y 2BS.2RL/2BL o 2BS.2BL/2RL en las plantas ROT, o 2BS.2BL y 2BS.2RL/2BL o 2BS.2BL/2RL en las plantas PAT, en función de la posición y número de quiasmas formados en paquitena. En azul se representa el material genético de trigo y en rojo y verde el de centeno.

El brazo 2BS del par cromosómico apareció asociado en todas las células en MI y por tanto formó al menos un sobrecruzamiento. La frecuencia con la que el brazo portador de la translocación se observó unido en MI, aparece indicada en la Tabla 12. En las plantas en que el brazo 2RL/2BL contenía la parte proximal de centeno y la distal de trigo se observa una reducción progresiva de la frecuencia de quiasmas, desde 91,5% hasta 60%, a medida que el punto de translocación se aleja del extremo en las plantas ROT, es decir, en las plantas en que el otro cromosoma del par tiene completo el brazo 2RL de centeno. En cambio en las plantas PAT, en que la pareja del brazo cromosómico translocado es el 2BL de trigo, la frecuencia de asociación aumenta con el tamaño del fragmento, presentando valores de 23,9% y 22,5% las plantas PAT2RL2 y PAT2RL12 con segmentos translocados pequeños (2,5% y 3,3% del brazo 2RL, respectivamente) y valores más altos, 75% y 81,2%, las plantas PAT2RL10 y PAT2RL19 con segmentos translocados mayores (6,6% y 10,8%, respectivamente). Tal como aparece reflejado en la Figura 28, de haberse producido recombinación homeóloga los cromosomas recombinantes podrían haber sido detectados en AI por presentar un marcaje distintivo. Tales cromosomas no se observaron y eso indica que el 10% distal del cromosoma 2BL da cuenta de la formación de sobrecruzamientos producidos en ese brazo, es decir, uno o más en el 81% de CMPs. La sustitución por translocación de ese 10% distal del brazo 2RL por su homeólogo de trigo produce una disminución del 40%, bastante lejos del 80% esperado en el supuesto de producirse solo un quiasma por brazo. Aunque la fracción de recombinación puede variar del trigo al centeno, estos resultados sugieren una frecuencia considerable de dobles o múltiples sobrecruzamientos en el brazo largo del grupo de homeología 2. La comparación entre la frecuencia de cromosomas recombinantes en AI y la frecuencia de asociación en MI indica que hay una buena correspondencia entre ambos en las plantas ROT2RL12, ROT2RL10 y ROT2RL19, y que las uniones de MI son producidas por quiasmas.

**Tabla 12.** Frecuencia (%) de asociación en MI del brazo portador de translocación 2RL/2BL con el brazo 2RL en las plantas ROT o con el brazo 2BL en la plantas PAT y frecuencia (%) de recombinación detectada en AI.

Tipo de plantas	Asociación en MI	CMPs	Recombinación detectada en AI	CMPs	$\chi^2$ de contingencia
ROT 2RL2	91.5	82	64	125	19.8***
ROT2RL12	80.9	115	81.7	60	0.014
ROT 2RL10	73.3	90	65.4	52	0.98
ROT 2RL19	60	110	61.5	109	0.05
PAT 2RL2	23.9	117	0	100	27.46***
PAT 2RL12	22.5	102	0	103	26.36***
PAT 2RL10	75	100	0	100	120.00***
PAT 2RL19	81.2	101	0	124	278.47***
ROT2BL12	70.9	110	0	113	123.07***
ROT2BL19	94.2	104	0	143	223.06***
ROT2BL15	93.0	115	0	75	159.45***
PAT2BL12	87.2	86	42.3	104	40.41***
PAT2BL19	43.3	90	54.9	102	2.53
PAT2BL15	63.2	114	23	100	34.82***

\*\*\* P<0.001

Las desviaciones significativas encontradas en la planta ROT2RL2 podrían deberse a factores ambientales o una frecuencia elevada de dobles sobrecruzamientos recíprocos. Las diferencias significativas encontradas en las plantas PAT se deben a que los recombinantes homólogos no pueden diferenciarse de los parentales. En la Figura 28 se muestran también los bivalentes de MI y cromosomas segregantes de AI esperados en el supuesto de que se dé o no sobrecruzamiento homólogo o homeólogo en las plantas PAT2BL12, PAT2BL19 y PAT2BL15. En estas plantas el cromosoma translocado 2BL/2RL contiene la parte proximal de trigo y la parte distal de centeno. No se observaron recombinantes homeólogos y, por tanto, los sobrecruzamientos fueron distales, entre segmentos homólogos de centeno, en las tres plantas ROT y proximales, en los segmentos homólogos de trigo, en las tres plantas PAT. Los resultados de la planta ROT2BL12 indican que en el segmento distal que representa el 4,8% del brazo 2RL de centeno puede producirse sobrecruzamiento con una frecuencia de 70%. El resto del brazo cromosómico de trigo conserva una alta capacidad de formar quiasmas, pues aparece unido con una frecuencia de 87,2% en la planta PAT2BL12. Esa capacidad

está bastante más restringida en las plantas PAT2BL19 (43,3%) y PAT2BL15 (63,2%). Al comparar la frecuencia de asociación en MI y la de cromosomas recombinantes en AI (Tabla 12) solo se observó una buena correspondencia en la planta PAT2BL19. Las diferencias altamente significativas de las plantas PAT2BL12 y PAT2BL15 pueden ser atribuidas a factores ambientales o a una frecuencia elevada de dobles sobre cruzamientos recíprocos.

## **DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

### 1. El bouquet propicia interacciones entre las regiones homólogas

Para detectar la existencia o no de interacciones entre regiones distales de los cromosomas estudiados en los tres reordenamientos cromosómicos; delección en el brazo largo del cromosoma 5RL, inversión de una zona distal a una proximal en el brazo largo del cromosoma 1RL y las líneas de translocación 1RS/1BS y 2RL/2BL, se midió el nivel de asociación en meiocitos desde leptotena temprana hasta paquitena. El bajo nivel de asociaciones homólogas encontradas entre los extremos del par de cromosomas involucrados en cada reordenamiento en meiocitos presinápticos está de acuerdo con trabajos previos que demuestran que los cromosomas homólogos ocupan territorios nucleares separados en meiosis temprana (Maestra et al., 2002, Corredor et al., 2007). El incremento de las asociaciones homólogas en cigotena implica una aproximación previa de los homólogos.

La distancia entre cromosomas homólogos puede alcanzar varias  $\mu\text{m}$  en organismos con genomas grandes, como en el caso del trigo, en el cual su núcleo en leptotena alcanza a tener un diámetro de  $\approx 24 \mu\text{m}$ . En esta situación, la reducción de la distancia entre homólogos requiere de movimientos activos de los cromosomas que causen su aproximación física. Estos movimientos pueden ser generados por la formación del bouquet telomérico, en el cual los telómeros migran desde el sitio del núcleo en el que se encuentren, a una región específica de la membrana nuclear donde se agrupan. Esta agrupación se configura en oposición a la de los centrómeros que se agrupan en el polo opuesto debido a la configuración Rabl con que entran los cromosomas en meiosis (Maestra et al., 2002). Se puede argumentar que la configuración de Rabl facilita los movimientos teloméricos polarizados. Sin embargo, las fuerzas del citoesqueleto que convergen y operan en la superficie nuclear, son capaces de desplazar y agrupar los telómeros de los cromosomas telocéntricos, ubicados en el polo centromérico, y los de aquellos cromosomas con dos brazos, ubicados en el polo opuesto (Maestra et al., 2002). Los movimientos cromosómicos derivados de la migración telomérica pueden explicar la aproximación de las regiones distales, pero no la de otras

regiones cromosómicas que pueden producirse por otro tipo de movimientos considerados en un apartado posterior. El comportamiento del telómero de 5RS en leptotena es una prueba fehaciente de la importancia de la formación del bouquet en la aproximación de los homólogos. Los fallos en la convergencia de estos telómeros son seguidos de fallos en el apareamiento sinapsis y recombinación en este brazo.

## **2. Papel que desempeñan las regiones específicas de DNA de los cromosomas estudiados en el apareamiento, sinapsis y recombinación**

En muchos eucariotas, incluidos trigo y centeno, el reconocimiento homólogo depende de la producción de DSBs (Gerton y Hawley, 2005). La reparación de las DSBs genera cadenas sencillas de DNA que invaden cadenas dobles de DNA de otros cromosomas identificando la del cromosoma homólogo por la complementariedad de las correspondientes pares de bases. La invasión de la doble cadena de DNA homóloga desencadena la reparación de cada DSB ya sea por la vía de la formación de sobrecruzamiento o por la vía de la conversión génica. La distribución de eventos de sobrecruzamiento y no sobrecruzamiento a lo largo del cromosoma es desigual en la mayoría de los organismos. En levaduras se ha podido comparar el mapa de eventos de sobrecruzamiento y no sobrecruzamiento con la distribución de DSBs a lo largo del cromosoma, encontrándose una buena correspondencia entre ambos (Mancera et al., 2008). A pesar de que las regiones cromosómicas pericentroméricas tienen un muy bajo número de sobrecruzamientos, en ellas, se producen dobles roturas (Blitzblau et al., 2007; Buhler et al., 2007) que deben ser reparadas mayoritariamente por la vía de conversión génica. En muchas plantas se produce una localización distal de los sobrecruzamientos, pero se desconoce cómo es la distribución de DSBs a lo largo del cromosoma. La distribución de los ENs en los SCs de distintas especies sugiere alguna actividad de recombinación sin sobrecruzamiento en regiones proximales (Anderson y Stack, 2005). En el caso particular del trigo, la localización distal de los quiasmas está relacionada con la existencia en esas regiones de una alta densidad génica (Gill et al., 1996a y 1996b). La iniciación de la sinapsis en los cromosomas de trigo se produce inicialmente cerca de los extremos y más tarde en sitios intercalares (Abirached-Darmency et al., 1983; Holm, 1986). En estas

regiones los homólogos han de reconocerse previamente. En los siguientes apartados discutiremos el papel de las distintas regiones cromosómicas estudiadas en el reconocimiento homólogo, la sinapsis y la recombinación en los cromosomas estudiados.

## **2.1.- Cromosoma 5R**

A partir de los resultados sobre el desarrollo de la sinapsis se puede extraer la conclusión, de que la deficiencia de dos tercios del brazo 5RL no causa una modificación significativa de la sinapsis en el tercio proximal restante de este brazo. Esto implica que el mecanismo responsable del apareamiento y reconocimiento homólogo opera en este segmento proximal como en la región distal. Por lo tanto, el apareamiento de 5RL no depende de secuencias localizadas en una región específica del cromosoma, sino que cualquier tramo del cromosoma es capaz de participar en la búsqueda de homología. La baja frecuencia de sobrecruzamientos proximales producidos en el brazo 5RL delecionado sugiere que, en ese tramo del brazo, la búsqueda de homología debe estar asociada a la reparación de las DSBs mediante conversión génica.

La heterocigosis para la delección causa fallos en la sinapsis en el tercio proximal de 5RL presente en del5RL. Estudios previos de delección en homocigotos y heterocigotos revelaron que la homología en el extremo del cromosoma es esencial para iniciar el apareamiento que conduce a la formación de asociaciones quiasmáticas en MI (Curtis et al., 1991; Endo et al., 1991; Lukaszewski, 1995; Gill et al., 1997; Jones et al., 2002; Qi et al., 2002). Cuando hay homología en la zona distal el apareamiento y sinapsis progresan del extremo al centro del cromosoma (Corredor et al., 2007). Cuando no hay homología en la zona distal, como sucede en heterocigotos para deleciones, aunque el agrupamiento telomérico conduce a una estrecha aproximación de los extremos de los cromosomas estándar y deficiente, la falta de homología en sus regiones subteloméricas dificulta la yuxtaposición de los segmentos homólogos que comparten causando fallos en la sinapsis, incluso cuando los segmentos que se pierden son pequeños. La sinapsis entre los segmentos proximales compartidos por el cromosoma intacto 5RL y del5RL en heterocigotos para la delección, podría ser o una extensión de la sinapsis en el brazo adyacente 5RS o el resultado de encuentros fortuitos producidos por el

movimiento activo de los cromosomas durante este estado de la profase I (Conrad et al., 2008).

Aunque la pérdida del 70% de la porción distal de 5RL no causó perturbaciones en la sinapsis del segmento proximal restante en homocigotos del5R/del5R, sí afectó severamente a la frecuencia de sobrecruzamiento. Sólo el 11.9% de los meiocitos en metafase I mostraron uniones quiasmáticas de del5R, valor muy inferior a 83.2% que presentó el brazo 5RL intacto. Los efectos de la delección fueron incluso más altos en heterocigotos donde no se observó ninguna asociación quiasmática entre del5RL y 5RL. Una fuerte reducción de la frecuencia de quiasmas es una situación común en heterocigotos para deficiencias en trigo, pero la frecuencia de asociaciones quiasmáticas se restaura a un nivel normal en homocigotos para cromosomas deficientes (Curtis et al., 1991; Endo et al., 1991; Lukaszewski, 1995; Gill et al., 1997; Jones et al., 2002; Qi et al., 2002). La construcción de mapas genéticos, en combinación con datos de apareamiento en MI ha demostrado que la baja frecuencia de recombinación de regiones intercalares del cromosoma 5B de trigo se puede aumentar desplazándolas al extremo del cromosoma mediante una deficiencia (Jones et al., 2002; Qi et al., 2002). En el brazo deficiente del cromosoma del5BL, carente del 41% distal, el aumento en la recombinación afecta principalmente a su parte más extrema, pero no afecta a la región más proximal. En el cromosoma con el brazo intacto 5RL, los quiasmas observados estaban confinados a la mitad distal; no hubo quiasmas en el tercio proximal, que aparecieron separados de la región de sobrecruzamientos por una aparente constricción secundaria (Figura 7C). Se produjeron algunos sobrecruzamientos en la región más distal del brazo deficiente del5RL, pero su frecuencia no alcanzó el nivel observado en cromosomas de trigo con menores deficiencias. Estos resultados demuestran que la posición en el eje centrómero-telómero no es suficiente para explicar la escasa recombinación proximal. A una conclusión similar condujo el estudio del efecto de una inversión en el brazo cromosómico de centeno 1RL (Lukaszewski, 2008). Por lo tanto, debe existir un mecanismo genético que controle la formación de sobrecruzamientos en regiones específicas. La ausencia de quiasmas proximales puede deberse a factores tales como la secuencia de DNA o la organización de la cromatina en esta parte del cromosoma. Congruentes con esta conclusión es la derivada de la elaboración de

mapas físicos y genéticos en trigo que revelan diferencias en densidad de genes a lo largo del eje telómero-centrómero siendo las regiones proximales bajas en recombinación y pobres en genes, mientras que las regiones distales tienen alta recombinación y son ricas en genes (Gill et al., 1993 1996a, 1996b). Por lo tanto, las posibilidades de manipular la recombinación por reordenamientos cromosómicos que cambien la posición del segmento, disminuye fuertemente con su proximidad al centrómero.

## **2.2.- Brazo cromosómico 1RL**

El estudio del apareamiento en MI de homocigotos y heterocigotos para la inversión, confirma el cambio de localización de los quiasmas de la región distal a la región proximal (Lukaszewski, 2008). Aunque esta inversión cromosómica no afecta el reconocimiento de homología y sinapsis del brazo 1RS, el apareamiento de este brazo en MI fue reducido en los homocigotos para la inversión. Tal reducción es específica de la línea y no fue afectada por la inversión (Lukaszewski, 2008). Por el contrario, en los homocigotos y heterocigotos para la inversión, se observó una mayor reducción del apareamiento en MI del brazo 1RL, de hecho, estuvo acompañada de fallos en el reconocimiento homólogo y la sinapsis. Los resultados obtenidos en meiosis temprana para el comportamiento del centrómero y del marcador distal de 1RL y para los patrones sinápticos de este brazo, proporcionaron una información relevante en relación a la dinámica de regiones con alta y baja frecuencia de sobrecruzamiento en la identificación de la pareja homóloga y en el inicio y progresión de la sinapsis.

La ausencia de quiasmas en la mitad proximal de los cromosomas es común en la mayoría de las especies de Triticeae, trigo y centeno. En relación al cartografiado físico de sobrecruzamientos, este estudio ha identificado una pequeña región del cromosoma que alberga el 70% de todos los sobrecruzamientos en el heterocigoto 1RL/1RL<sub>inv</sub>. Las regiones ricas en sobrecruzamientos están flanqueadas por el centrómero, por un lado, y por el cromómero proximal del cromosoma invertido, por el otro. En paquitena, esto representa el 10% de la longitud del brazo 1RL<sub>inv</sub>. Un segmento homólogo de una longitud comparable ubicado distalmente en el brazo 1RL normal está flanqueado por los cromómeros distal y subdistal en la línea 1R/1R. Los cromosomas de

centeno son polimórficos para estos marcadores citológicos, lo cual fue usado por Lukaszewski, (1992) para estimar una frecuencia de recombinación de 3.1% para este segmento distal y 48.7% para un segmento adyacente delimitado por el cromómero subdistal y un tercer cromómero situado en el centro del brazo. Algunas dificultades metodológicas en la identificación de cromosomas parentales y recombinantes podrían explicar, al menos en parte, la baja frecuencia de recombinación detectada por Lukaszewski en el segmento más distal de 1RL.

La frecuencia de sobrecruzamiento estimada en el ditelocéntrico heterocigótico para la inversión es menor que la del homocigoto estándar, que presenta una mayor frecuencia de uniones en MI. La elaboración de un mapa genético de alta resolución en centeno permitió determinar una longitud genética del brazo 1RL de 74 cM (Gustafson et al, 2009). A partir de la frecuencia de CMPs con uno y dos sobrecruzamientos en el heterocigoto 1RL/1RLinv, se puede hacer también una estimación de la longitud genética de dicho brazo como sigue. La longitud genética (L) de un segmento cromosómico en el que se produce un sobrecruzamiento con una frecuencia  $f_1$ , dos sobrecruzamientos con una frecuencia  $f_2$ , tres sobrecruzamientos con una frecuencia  $f_3$ , y así sucesivamente, viene dada por la expresión,  $L = 50(f_1 + 2f_2 + 3f_3 + nf_n)$  (Lacadena, 1981). Aplicando esta expresión al heterocigoto 1RL/1RLinv se obtiene una longitud genética de 26,97 cM, que representa un 36% de la longitud genética del brazo 1RL estándar. Tal proporción parece suficiente como para considerar que la distribución de sobrecruzamientos en el diheterocigoto para la inversión es representativa de la que se produce en el brazo 1RL estándar.

Nuestros resultados indican que el 10% distal del brazo 1RL no solo alberga una buena parte de todos los sobrecruzamientos producidos en este brazo, sino que también es esencial en la búsqueda de la pareja homóloga, inicio, y desarrollo de la sinapsis. En efecto, la homocigosis para la inversión produjo un fallo en la sinapsis en la región distal del brazo invertido, es decir, en la región con una frecuencia baja de sobrecruzamientos. El fallo sináptico ocurrió independientemente de si el marcador subtelomérico estaba asociado o no, lo que indica que esa región fue menos eficaz que la región con alta frecuencia de sobrecruzamientos, en el alineamiento y ensamblaje del SC. Esto implica que el apareamiento, sinapsis y sobrecruzamiento son dependientes de secuencias de

DNA. Además, estos sucesos están interconectados por la actividad multifuncional de las proteínas de recombinación Mer3, Msh4 y Mlh1. Estas proteínas, que están implicadas en las interacciones cromosómicas que conducen a la producción de sobrecruzamientos durante la transición de leptotena a cigotena, cigotena y paquitena, desempeñan un papel directo en el apareamiento y en la identificación del cromosoma homólogo (Storlazzi et al., 2010). La existencia de una región específica involucrada en los tres procesos: apareamiento, sinapsis y recombinación, y de otras regiones que no parecen estar involucradas con cualquiera de los tres, indica una diferenciación intracromosomal de 1RL en el control de los eventos de la meiosis.

Se puede argumentar que los cromosomas de trigo podrían afectar al número y distribución de sobrecruzamientos en el brazo 1RL. Sin embargo, la localización de los quiasmas en la mitad distal del brazo normal 1RL se mantiene tanto en la línea disómica trigo-1R como en la línea trigo-1RL. Los cromosomas de trigo provocan, respectivamente una reducción en el número de quiasmas en el brazo 1RL, pero solo cuando lleva un bloque de heterocromatina subtelomérica, especialmente en heterocigosis (Naranjo y Lacadena, 1980). Por consiguiente, el retraso del inicio de la sinapsis detectado en el ditelocéntrico normal (1RL/1RL) podría haber sido generado por presentar un cromómero distal de un tamaño mayor que el homocigoto para el cromosoma estándar (1R/1R). El alto grado de compactación de la cromatina en el cromómero distal, puede aumentar la resistencia a los movimientos durante la migración telomérica y cabe esperar que los cromómeros más grandes se muevan más lentamente que los cromómeros de menor tamaño.

### **2.3.- Cromosomas de las líneas de translocación: brazo cromosómico de centeno 1RS y brazo cromosómico de trigo 1BS**

La utilización de las translocaciones trigo-centeno 1RS/1BS ha permitido comprobar el efecto que, la sustitución del extremo del brazo 1RS por material genético de trigo del brazo 1BS, produce en la sinapsis y formación de quiasmas con un brazo cromosómico 1RS completo en las plantas denominadas ROT. Asimismo, se ha podido comprobar la capacidad de producir sobrecruzamientos

del segmento translocado de trigo 1BS con su homólogo del cromosoma 1B en las plantas PAT.

Los resultados observados en la primera de las situaciones consideradas en el apartado anterior ponen de manifiesto una reducción considerable de la sinapsis entre los brazos 1RS/1BS y 1RS en aquellas plantas en que el segmento translocado de 1BS es mayor (Figura 21). Este resultado es congruente con un papel relevante de las regiones próximas a los extremos en el reconocimiento homólogo. Llama la atención el hecho de que son precisamente dos plantas con segmento translocado mayor (ROT14 y ROT6) las que muestran un considerable aumento en el número de fallos sinápticos, sugiriendo que la identificación homóloga y la sinapsis se desencadenan principalmente en la región del brazo 1RS ausente en esas dos translocaciones.

Respecto a la formación de quiasmas en los brazos 1RS/1BS, la frecuencia de cromosomas recombinantes observados en AI presenta una buena correspondencia con la frecuencia de uniones en MI indicando que esas uniones en metafase son producidas por quiasmas y que dichos quiasmas ocurren entre secuencias homólogas de centeno. Los sobrecruzamientos estimados a partir de los resultados de AI se producen con frecuencias que varían entre el 23% y el 53%. Estas frecuencias son claramente menores que la frecuencia con la que se desarrolla sinapsis completa en las plantas ROT9, ROT8 y ROT26, cuyos segmentos translocados son más pequeños, sugiriendo que estas regiones pueden desarrollar sinapsis aunque no produzcan sobrecruzamiento.

En las plantas PAT con brazos 1RS/1BS y 1BS, no se pudo averiguar cómo era la sinapsis de esos brazos, pero sí estimar los sobrecruzamientos producidos entre las regiones homólogas de trigo 1BS. En esas regiones la frecuencia de sobrecruzamiento estimada a partir de las uniones en MI aumentaba con el tamaño del segmento translocado 1BS desde 50% hasta el 71,8%. Estos valores están indicando una mayor frecuencia de sobrecruzamientos en la región distal, que cubre el 18,7% de estos brazos (situada en el satélite del brazo 1RS) que en su parte proximal.



#### **2.4.- Cromosomas de las líneas de translocación: brazos cromosómicos 2RL y 2BL**

Los dos tipos de plantas utilizadas en estas translocaciones, translocaciones 2RL/2BL, brazo con la zona proximal de centeno y la zona distal de trigo, y translocaciones 2BL/2RL, brazo con la zona proximal de trigo y la zona distal de centeno, presentaron un desarrollo de la sinapsis del segmento de centeno rápido y completo cuando era distal, más lento y con más fallos cuando era proximal. Este comportamiento es congruente con lo encontrado en otros brazos cromosómicos de centeno mencionados en apartados anteriores.

En cuando a la frecuencia y distribución de quiasmas en el brazo 2BL los resultados obtenidos confirman también la ausencia de recombinación homeóloga trigo-centeno debido a la presencia del gen *Ph1*. Los brazos 2RL y 2BL forman quiasmas con una frecuencia alta en su parte distal, el 10,5% del brazo 2BL es capaz de formar quiasmas en el 81% de las CMPs y el 11% del brazo 2RL forma quiasmas en el 93% de las CMPs. Porciones distales equivalentes de los brazos 2BL y 2RL, pero de menor tamaño fueron el segmento 2BL translocado en la translocación 2RL10 con un tamaño del 6,6% y el segmento 2RL translocado en la translocación 2BL19 con un tamaño del 6,7% del brazo 2RL. Estos segmentos también formaron menos quiasmas en el caso de 2BL (75%) que si eran de centeno (94,2%). Hay por tanto una localización distal de los quiasmas más acusada en el caso del brazo de centeno que en el de trigo. Un razonamiento similar se puede seguir con el segmento comprendido entre el punto de translocación y el centrómero de esos dos brazos. Dicho segmento cuando es de centeno aparece unido por algún quiasma en MI con una frecuencia de 73,3% (planta ROT2RL10, tabla 12) y cuando es de trigo aparece unido por algún quiasma en MI con una frecuencia de 43,3%. Es decir, tanto en su parte distal como en el resto del brazo, 2RL es capaz de formar más quiasmas que 2BL. Tal diferencia puede ser producto de la diferenciación cromosómica producida durante la evolución de estas especies. La mayor frecuencia de sobrecruzamientos en el brazo de centeno que en el de trigo no se corresponde con las diferencias en longitud genética entre estos brazos determinadas mediante la construcción de mapas genéricos de cada especie. El brazo 2RL presenta una longitud genética de 20,5 cM

en un mapa elaborado con 16 marcadores (Gustafson et al., 2009) mientras que la longitud genética de 2BL en un mapa elaborado con dos marcadores asciende a 87,1 cM (Quarrie et al., 2005). Esta discordancia sugiere que la frecuencia de sobrecruzamiento entre cromosomas de centeno aumenta considerablemente cuando se sitúan en un fondo genético de trigo.

### **3.- Efecto de la estructura cromosómica en el reconocimiento de los cromosomas homólogos**

La delección del 70% del brazo 5RL estudiada supone que el cromosoma delecionado tenga una conformación distinta a la del cromosoma 5R normal, metacéntrico el primero y submetacéntrico el segundo. Sin embargo, el brazo 5RS es exactamente igual en tamaño en ambos cromosomas y por ello se esperaría que presentara un comportamiento similar en ambos cromosomas. No obstante, hay diferencias notables en el grado de sinapsis y en el número de quiasmas, siendo ambos más elevados en el cromosoma delecionado que en el normal. El seguimiento del comportamiento de los telómeros de dicho brazo durante la formación del bouquet ha puesto de manifiesto un mayor número de fallos en la incorporación de los telómeros de 5RS al agregado telomérico en el caso del cromosoma 5R normal que en el que tiene la delección. Tales fallos mantienen un distanciamiento considerable entre los telómeros y zonas subteloméricas de los brazos 5RS homólogos que impiden su reconocimiento e interacción para desarrollar la sinapsis y producir sobrecruzamientos. La única explicación de este comportamiento desigual es la diferente disposición que adquiere el cromosoma dentro del núcleo determinada por la longitud del brazo 5RL. Cuando este es más largo la conformación que adopta el cromosoma puede suponer una mayor resistencia a que el telómero del brazo corto se desplace y se agrupe con los demás telómeros. La variación en la disposición de ambos tipos de cromosomas en el núcleo aparece representada esquemáticamente en la figura 6D.

La segregación apropiada de los homólogos en AI necesita que hayan formado al menos un quiasma en profase I. No todos los meiocitos de los homocigotos normales para el cromosoma 5R formaron al menos un quiasma en el brazo 5RL. Este brazo estuvo desapareado en un 16.8% de las CMPs en MI. Esto y la baja frecuencia de asociaciones quiasmáticas de 5RS dio un porcentaje de 14%

de las CMPs (resultado no mostrado) con dos univalentes en MI. El nivel relativamente alto de esta irregularidad meiótica afecta a la transmisión del cromosoma 5R y, por lo tanto, genera aneuploidía entre la progenie. Esto sugiere que el efecto negativo de la conformación cromosómica en la formación de quiasmas podría tener implicaciones evolutivas en la estructura cromosómica de las especies, a no ser que éstas desarrollen algún mecanismo de corrección. Este parece ser el caso del mismo centeno. En ausencia de cromosomas de trigo, el cromosoma 5R muestra un apareamiento regular en MI y lo mismo sucede con otros cromosomas de centeno (Naranjo et al., 1979; Naranjo y Lacadena, 1980, 1982). La presencia de cromosomas de trigo afecta más al apareamiento en MI de brazos cromosómicos de centeno con heterocromatina subtelomérica, que al apareamiento de brazos que carecen de ella (Naranjo y Lacadena, 1980, 1982). Esto sugiere que los cromómeros heterocromáticos subteloméricos pueden ser responsables del fallo de la sinapsis y de la formación de quiasmas en cualquier par de brazos 5RS. El alto grado de condensación y el tamaño de los cromómeros heterocromáticos podrían generar resistencia al movimiento de los telómeros adyacentes durante leptotena y afectar la sinapsis y recombinación. Tal resistencia podría ser la misma para la delección y los homocigotos estándar, pero la arquitectura del cromosoma normal representa un factor adicional condicionando la disposición de 5RS en la estructura del bouquet.

La inversión del brazo cromosómico 1RL ha puesto de manifiesto diferencias en el comportamiento de los cromosomas normales e invertidos. Además de alterar la localización de los quiasmas que, en el cromosoma invertido, pasa a ser proximal en lugar de distal también se ve afectado el reconocimiento de los homólogos y el desarrollo de la sinapsis, que sufren más fallos en los homocigotos para la inversión. El comportamiento de los cromosomas normal e invertido en los heterocigotos para la inversión revela una mayor capacidad de las regiones ricas en sobrecruzamiento, para encontrar el homólogo que las regiones pobres en sobrecruzamiento. En los heterocigotos para la inversión con cromosomas completos la región rica en sobrecruzamientos del cromosoma normal se sitúa en el polo telomérico durante la formación del bouquet, mientras que la del cromosoma invertido permanece en el polo centromérico. A pesar de este distanciamiento, ambas regiones homólogas son capaces de aproximarse,

interactuar y producir sinapsis y sobrecruzamiento. El modo por el que se logra la aproximación de estas regiones situadas en polos opuestos del núcleo no puede ser explicado por la convergencia de los telómeros durante la formación del bouquet, ya que cuando este se consolida los centrómeros permanecen en el polo opuesto a los telómeros (Maestra et al., 2002). Ha de ser otro, el movimiento cromosómico capaz de aproximar regiones proximales y distales. Este movimiento muy probablemente es el derivado de la remodelación de la organización de la cromatina producida al comienzo de la meiosis. Como consecuencia de esta remodelación de la cromatina el cromosoma se alarga enormemente aumentando su longitud del orden de cuatro o cinco veces (Mikhailova et al., 1998). La longitud que adquiere el cromosoma es muy superior al diámetro del núcleo lo que le obliga a describir movimientos serpenteantes y extenderse por gran parte del volumen nuclear. Este despliegue cromosómico puede dar lugar a encuentros fortuitos entre regiones muy distantes antes de la descondensación de la cromatina (Corredor et al., 2007; Naranjo, 2012). La aproximación de las regiones homólogas ricas en sobrecruzamiento localizadas en polos opuestos del núcleo muy probablemente fuera facilitada por este tipo de movimiento cromosómico.

#### **4.- Corrección del apareamiento cromosómico y de la sinapsis**

Si los movimientos cromosómicos presinápticos son importantes para la aproximación e identificación de los homólogos, otros movimientos cromosómicos como los encargados de desorganizar el bouquet aparecen también implicados en el correcto emparejamiento y sinapsis de los cromosomas homólogos. El comportamiento de los cromosomas con la inversión indica que la dispersión de los telómeros durante cigotena está acompañada de una reducción de la frecuencia de asociación de los cromómeros distales en los heterocigotos para la inversión, al mismo tiempo que las regiones distales continúan interactuando con las regiones proximales del cromosoma homólogo. Todas las asociaciones entre cromómeros distales detectados en la transición leptotena-cigotena en el heterocigoto para la inversión con cromosomas telocéntricos, y la mitad de las observadas en el heterocigoto para la inversión con cromosomas con dos brazos, no dan lugar a sinapsis estable y desaparecen durante la desorganización del bouquet (Figura 14). Igualmente, la mayoría de las asociaciones centroméricas del heterocigoto

para la inversión ditelocéntrico en la etapa de bouquet, desaparecen con la desorganización de esta estructura supracromosómica. Este comportamiento sugiere que la desorganización del bouquet colabora en la corrección del apareamiento y la sinapsis mediante la eliminación de las asociaciones cromosómicas incorrectas e inestables permitiendo así que los cromosomas homólogos interactúen de una manera más estable y correcta. La diferencia entre asociaciones estables e inestables puede residir en la capacidad que tengan para generar o no sobrecruzamiento.

Este es muy probablemente el mecanismo de reparación del apareamiento que opera en los trigos poliploides. En estas especies los cromosomas homólogos y homeólogos compiten en el apareamiento cromosómico al comienzo de la meiosis, dando lugar a la formación de multivalentes en cigotena producto de la sinapsis entre homólogos y homeólogos. Tales multivalentes se transforman en bivalentes homólogos durante cigotena tardía y paquitena en presencia del gen *Ph1* (Hobolth, 1981; Holm, 1986; Martínez et al., 2001a). El gen *Ph1* es responsable de que se formen quiasmas únicamente entre cromosomas homólogos, pero cuando está ausente se pueden formar también quiasmas entre homeólogos y los multivalentes persisten hasta MI (Holm y Wang, 1988; Luo et al., 1996). La ausencia de sobrecruzamiento entre homeólogos en presencia del gen *Ph1* podría ser causante de la inestabilidad de la sinapsis homeóloga y su desaparición durante la desorganización del bouquet, facilitándose así la completa extensión de la sinapsis homóloga. En ausencia del gen *Ph1*, la reparación de DSBs vía sobrecruzamiento entre homeólogos estaría permitida, proporcionando estabilidad a la sinapsis entre homeólogos en los multivalentes en profase I, que pueden así alcanzar MI.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. Los diferentes tipos de reordenaciones cromosómicas estudiadas han permitido concluir que las zonas distales de los brazos cromosómicos 1RS, 1RL, 2RL y 5RL juegan un importante papel en el reconocimiento de los cromosomas homólogos, la iniciación de la sinapsis y la formación de sobrecruzamientos.
2. La región proximal del brazo 1RL tiene un papel menos relevante que la distal en el reconocimiento homólogo e iniciación de la sinapsis. En cambio, en el caso del cromosoma 5R, el 30% proximal de este cromosoma muestra una eficacia similar a su parte distal en el reconocimiento homólogo y desarrollo de la sinapsis, pero no en la producción de sobrecruzamientos.
3. En los brazos cromosómicos 1RS, 1RL y 2RL la mayoría de los sobrecruzamientos se producen en regiones cromosómicas distales que representan entre el 10% y el 15% de la longitud del brazo cromosómico.
4. La capacidad de generar sobrecruzamientos está condicionada por la secuencia de DNA y no por la posición de la región considerada en el eje telómero-centrómero.
5. En el brazo cromosómico 1RL, las regiones ricas en sobrecruzamientos muestran una mayor capacidad para encontrar la pareja homóloga que las regiones pobres en sobrecruzamientos.
6. El brazo 2RL de centeno forma, en un fondo genético de trigo, más sobrecruzamientos que su homeólogo de trigo 2BL.
7. Al comienzo de la meiosis los cromosomas ocupan territorios nucleares separados y para interactuar han de aproximarse. Esta aproximación se produce en sus zonas distales con la formación del bouquet.

8. Regiones homólogas situadas distalmente en un cromosoma y en posición proximal en el homólogo, debido a una inversión, no se aproximan por la formación del bouquet. Un movimiento cromosómico derivado del despliegue de la cromatina y elongación del cromosoma es probablemente el responsable de la interacción entre esas regiones.
9. La conformación cromosómica afecta a la aproximación de los homólogos al comienzo de la meiosis. Al comienzo de cigotena, los extremos del brazo 5RS quedan distanciados más frecuentemente cuando este brazo está unido al brazo 5RL normal que cuando está unido a un brazo 5RL con una delección del 70% de su longitud.
10. La desorganización del bouquet permite la desaparición de asociaciones cromosómicas incorrectas e inestables producidas en la formación del bouquet. Por tanto, los movimientos cromosómicos causantes de la dispersión telomérica pueden formar parte del mecanismo corrector del apareamiento.



## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Abirached-Darmency, M., Zickler, D., & Cauderon, Y. (1983). Synaptonemal complex and recombination nodules in rye (*Secale cereale*). *Chromosoma*, 88(4), 299-306.
- Abranches, R., Beven, A., Aragon-Alcaide, L., & Shaw, P. (1998). Transcription sites are not correlated with chromosome domains in wheat nuclei. *Journal of cell biology*, 143, 5-12.
- Agarwal, S., & Roeder, G. S. (2000). Zip3 Provides a Link between Recombination Enzymes and Synaptonemal Complex Proteins. *Cell*, 102(2), 245-255.
- Akhunov, E. D., Goodyear, A. W., Geng, S., Qi, L.-L., Echalier, B., Gill, B. S., et al. (2003). The organization and rate of evolution of wheat genomes are correlated with recombination rates along chromosome arms. *Genome Research*, 13, 753-763.
- Albini, S. M., & Jones, G. H. (1987). Synaptonemal complex spreading in *Allium cepa* and *A. fistulosum*. I. The initiation and sequence of pairing. *Chromosoma*, 95, 324-338.
- Allers, T., & Lichten, M. (2001). Differential Timing and Control of Noncrossover and Crossover Recombination during Meiosis. *Cell*, 106(1), 47-57.
- Anderson, L. K., Salameh, N., Bass, H. W., Harper, L. C., Cande, W. Z., Weber, G., et al. (2004). Integrating genetic linkage maps with pachytene chromosome structure in Maize. *Genetics*, 166(4), 1923-1933.
- Anderson, L. K., & Stack, S. M. (2005). Recombination nodules in plants. *Cytogenetic and Genome Research*, 109, 198-204.
- Aragon-Alcaide, L., Reader, S., Beven, A., Shaw, P., Miller, T., & Moore, G. (1997). Association of homologous chromosomes during floral development. *Current Biology* 7, 905-908
- Armstrong, S. J., Franklin, F. C., & Jones, G. H. (2001). Nucleolus-associated telomere clustering and pairing precede meiotic chromosome synapsis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Cell Science*, 114(23), 4207-4217.
- Ault, J. G., & Nicklas, R. B. (1989). Tension, microtubule rearrangements, and the proper distribution of chromosomes in mitosis. *Chromosoma*, 98, 33-39.

- Bähler, J., Wyler, T., Loidlf, J., & Kohli, J. (1993). Unusual nuclear structures in meiotic prophase of fission yeast: a cytological analysis. *The Journal of Cell Biology*, 121, 241-256.
- Bass, H. W., Riera-Lizarazu, O., Ananiev, E. V., Bordoli, S. J., Rines, H. W., Phillips, R. L., et al. (2000). Evidence for the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. *Journal of cell science*, 113, 1033-1042.
- Bennett, M. D. (1979). Centromere arrangements in *Triticum aestivum* and their relation to synapsis. *Heredity*, 43, 157.
- Bennett, M. D., Smith, J. B., Simpson, S., & Wells, B. (1979). Intranuclear fibrillar material in cereal pollen mother cells. *Chromosoma*, 71, 289-332.
- Bhalla, N., & Dernburg, A. F. (2008). Prelude to a division. *Annual Reviews Cell and Developmental Biology*, 24, 397-424.
- Blitzblau, H. G., Bell, G. W., Rodriguez, J., Bell, S. P., & Hochwagen, A. (2007). Mapping of meiotic single-stranded DNA reveals double-strand-break hotspots near centromeres and telomeres. *Current Biology*, 17(23), 2003-2012.
- Börner, V., Kleckner, N., & Hunter, N. (2004). Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell*, 117(1), 29-45.
- Bozza, C. G., & Pawlowski, W. P. (2008). The cytogenetics of homologous chromosome pairing in meiosis in plants. *Cytogenetic and Genome Research*, 120, 313-319.
- Brar, G. A., & Amon, A. (2008). Emerging roles for centromeres in meiosis I chromosome segregation. *Natural reviews genetics*, 9(12), 899-910.
- Brown, W., & Stack, S. (1968). Somatic pairing as a regular preliminary to meiosis. *Bulletin of the torrey botanical club*, 95, 369-378.
- Buard, J., & de Massy, B. (2007). Playing hide and seek with mammalian meiotic crossover hotspots. *Trends in genetics*, 23, 301-309.
- Buhler, C., Borde, V., & Lichten, M. (2007). Mapping meiotic single-strand DNA reveals a new landscape of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biology*, 5(12), e324.

- Carlton, P. M., & Cande, W. Z. (2002). Telomeres act autonomously in maize to organize the meiotic bouquet from a semipolarized chromosome orientation. *Journal of cell biology*, 157, 231-242.
- Carlton, P. M., Cowan, C. R., & Cande, W. Z. (2003). Directed motion of telomeres in the formation of the meiotic bouquet revealed by time course and simulation analysis. *Molecular biology of the cell*, 14, 2832-2843.
- Church, K. (1981). The architecture of and chromosome movements within the premeiotic interphase nucleus. In F. A. Zimmerman AM (Ed.), *Mitosis/Cytokinesis* (pp. 83-102 ). Academic Press Inc, New York.
- Church, K., & Moens, P. (1976). Centromere behaviour during interphase and meiotic prophase in *Allium fistulosum* from 3-D, E.M. reconstruction. *Chromosoma*, 56, 249-263.
- Cifuentes, M., Grandont, L., Moore, G., Chèvre, A. M., & Jenczewski, E. (2010). Genetic regulation of meiosis in polyploid species: new insights into an old question. *New Phytologist*, 186(1), 29-36.
- Cnudde, F., & Gerats, T. (2005). Meiosis: Inducing variation by reduction. *Plant biology*, 7, 321-341.
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature reviews genetics*, 6, 836-846.
- Comings, D. E. (1968). The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. *American journal of human genetics*, 20(5), 440-460.
- Compton, D. A. (2007). Chromosome orientation. *Journal of cell biology*, 179, 179-181.
- Conrad, M. N., Lee, C., Chao, G., Shinohara, M., Kosaka, H., Shinohara, A., et al. (2008). Rapid telomere movement in meiotic prophase is promoted by NDJ1, MPS3, and CSM4 and is modulated by recombination. *Cell*, 133(7), 1175-1187.
- Cooper, J. P., Watanabe, Y., & Nurse, P. (1998). Fission yeast Taz1 protein is required for meiotic telomere clustering and recombination. *Nature*, 392, 828-831.
- Corredor, E., Lukaszewski, A. J., Pachón, P., Allen, D. C., & Naranjo, N. (2007). Terminal regions of wheat chromosomes select their pairing partners in meiosis. *Genetics*, 177, 699-706.

- Corredor, E., & Naranjo, T. (2007). Effect of colchicine and telocentric chromosome conformation on centromere and telomere dynamics at meiotic prophase I in wheat-rye additions. *Chromosome Research*, 15, 231-245.
- Costa, Y., & Cooke, H. (2007). Dissecting the mammalian synaptonemal complex using targeted mutations. *Chromosome Research*, 15(5), 579-589.
- Cowan, C. R., & Cande, W. Z. (2002). Meiotic telomere clustering is inhibited by colchicine but does not require cytoplasmic microtubules. *Journal of cell science*, 115, 3747-3756.
- Cowan, C. R., Carlton, P. M., & Cande, W. Z. (2001). The polar arrangement of telomeres in interphase and meiosis: Rabl organization and the bouquet. *Plant Physiology*, 125, 532-538.
- Cromie, G. A., Hyppa, R. W., Cam, H. P., Farah, J. A., Grewal, S. I. S., & Smith, G. R. (2007). A discrete class of Intergenic DNA dictates meiotic DNA break hotspots in Fission yeast. *PLoS Genetic*, 3(8), 1496-1507.
- Curtis, C. A., & Lukaszewski, A. J. (1991). Genetic linkage between C-bands and storage protein genes in chromosome 1B of tetraploid wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 81, 245-252.
- De Muyt, A., Jessop, L., Kolar, E., Sourirajan, A., Chen, J., Dayani, Y., et al. (2012). BLM helicase ortholog Sgs1 is a central regulator of meiotic recombination intermediate metabolism. *Molecular Cell*, 46(1), 43-53.
- Del Fosse, F., & Church, K. (1981). Presynaptic chromosome behaviour in *Lillium* . I. Centromere orientation and movement during premeiotic interphase in *Lillium speciosum* cv. Rosemede. *Chromosoma*, 81, 701-716.
- Dernburg, A. F., Sedat, J. W., Cande, W. Z., & Bass, H. W. (1995). Cytology of telomeres In *Telomeres* (ed. E. H. Blackburn and C. W. Greider) (pp. 295-338). New York.
- Ding, D., Okamasa, K., Yamane, M., Tsutsumi, C., Haraguchi, T., Yamamoto, M., et al. (2012). Meiosis-specific noncoding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. *Science*, 336(6082), 732-736.
- Dong, F., & Jiang, J. (1998). Non-Rabl patterns of centromere and telomere distribution in the interphase nuclei of plant cells. *Chromosome Research*, 6(7), 551-558.

- Driscoll, C., & Sears, E. (1971). Individual addition of the chromosomes of 'Imperial' rye to wheat. *Agron Abstr*, 6.
- Driscoll, C. J. (1972). Genetic suppression of homoeologous chromosome pairing in hexaploid wheat. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 14, 39-42.
- Dubkovsky, J., & Dvorak, J. (2007). Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, 316, 1862-1866.
- Eggler, A. L., Inman, R. B., & Cox, M. M. (2002). The Rad51-dependent pairing of long DNA substrates is stabilized by replication protein A. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39280-39288.
- Endo, T. R., Mukai, Y., Yamamoto, M., & Gill, B. S. (1991). Physical mapping of a male-fertility gene of common wheat. *The Japanese Journal of Genetics*, 66(3), 291-295.
- Fan, Q. Q., & Petes, T. D. (1996). Relationship between nuclease hypersensitive sites and meiotic recombination hot spot activity at the HIS4 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cell biology*, 16, 2037-2043.
- Feldman, M. (1966). The effect of chromosomes 5B, 5D, and 5A on chromosomal pairing in *triticum aestivum*. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 55, 1447-1453.
- Friebe, B., Zhang, P., Linc, G., & Gill, B. S. (2005). Robertsonian translocations in wheat arise by centric misdivision of univalents at anaphase I and rejoining of broken centromeres during interkinesis of meiosis II. *Cytogenetic and Genome Research*, 109(1-3), 293-297.
- Gaeta, R. T., & Pires, J. C. (2010). Homoeologous recombination in allopolyploids: the polyploid ratchet. *New Phytologist* 186, 18-28.
- Gale, M. D., & Miller, T. E. (1987). The introduction of alien genetic variation in wheat. In L. FGH (Ed.), *Wheat breeding: its scientific basis* (pp. 173-210). London: Chapman and Hall.
- Gerton, J. L., DeRisi, J., Shroff, R., Lichten, M., Brown, P. O., & Petes, T. D. (2000). Global mapping of meiotic recombination hotspots and coldspots in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 97, 11383-11390.
- Gerton, J. L., & Hawley, S. R. (2005). Homologous chromosome interactions in meiosis: Diversity amidst conservation. *Nature reviews genetics*, 6, 477-487.

- Gill, B. S., Gill, K. S., Friebe, B., & Endo, T. R. (1997). Expanding genetic maps: reevaluation of the relationship between chiasmata and crossovers. *Chromosomes today*, 12, 283-298.
- Gill, K. S., Gill, B. S., & Endo, T. R. (1993). A chromosome region-specific mapping strategy reveals gene-rich telomeric ends in wheat. *Chromosoma*, 102(6), 374-381.
- Gill, K. S., Gill, B. S., Endo, T. R., & Boyko, E. V. (1996a). Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 5 of wheat. *Genetics*, 143, 1001-1012.
- Gill, K. S., Gill, B. S., Endo, T. R., & Boyko, E. V. (1996b). Identification and high density mapping of gene-rich regions in chromosome group-1 of wheat. *Genetics*, 143, 1001-1012.
- Gillies, C. B. (1975). An ultrastructural analysis of chromosome pairing in maize. *C R Trav Lab Carlsberg*, 40, 135-161.
- Gillies, C. B. (1985). An electron microscopical study of synaptonemal complex formation at zygotene in rye. *Chromosoma*, 92, 165-175.
- Giorgi, B. (1978). A homoeologous pairing mutant isolated in *Triticum durum* cv. *Cappelli Mutation Breed. Newslett*, 11, 4--5.
- Golubovskaya, I., Harper, L., Pawlowski, W. P., Schichnes, D., & Cande, W. Z. (2002). The *Pam1* gene is required for meiotic bouquet formation and efficient homologous synapsis in maize (*Zea mays*, L.). *Genetics*, 162, 1979-1993.
- Griffiths, S., Sharp, R., Foote, T. N., Bertin, I., Wanous, M., Reader, S., et al. (2006). Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature*, 439, 749-752.
- Gustafson, J., Ma, X., Korzun, V., & Snape, J. (2009). A consensus map of rye integrating mapping data from five mapping populations. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 118(4), 793-800.
- Haizel, T., Lim, Y. K., Leitch, A. R., & Moore, G. (2005). Molecular analysis of holocentric centromeres of *Luzula* species. *Cytogenetic and Genome Research*, 109, 134-143.
- Harper, L., Golubovskaya, I., & Cande, W. Z. (2004). A bouquet of chromosomes. *Journal of cell science*, 117, 4025-4032.

- Heyting, G. (1996). Synaptonemal complexes: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 8, 389-396.
- Hobolth, P. (1981). Chromosome pairing in allohexaploid wheat var. Chinese Spring. Transformation of multivalents into bivalents, a mechanism for exclusive bivalent formation. *Carlsberg Research Communications*, 46, 129-173.
- Holm, P., & Wang, X. (1988). The effect of chromosome 5B on synapsis and chiasma formation in wheat, *triticum aestivum* cv. Chinese Spring. *Carlsberg Research Communications*, 53(2), 191-208.
- Holm, P. B. (1977). Three-dimensional reconstruction of chromosome pairing during the zygotene stage of meiosis in *Lilium longiflorum* (Thunb.). *Carlsberg Research Communications*, 42, 103-151.
- Holm, P. B. (1986). Chromosome pairing and chiasma formation in allohexaploid wheat, *Triticum aestivum* analyzed by spreading of meiotic nuclei. *Carlsberg Research Communications*, 51, 239-294.
- Hunter, N., Borner, V., Lichten, M., & Kleckner, N. (2001).  $\gamma$ -H2AX illuminates meiosis. *Nature genetics*, 27, 236 – 238.
- Hunter, N., & Kleckner, N. (2001). The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-Holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell*, 106, 59-70.
- Islam, A. K. N. R., & Shepherd, K. W. (1991). Alien genetic variation in wheat improvement. In T. T. Gupta PK (Ed.), *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution* (pp. 291-312). Amsterdam: Elsevier.
- Jampates, R., & Dvorak, J. (1986). Location of the *Ph1* locus in the metaphase chromosome map and the linkage map of the 5Bq arm of wheat. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 28, 511-519.
- Jensen-Seaman, M. I., Furey, T. S., Payseur, B. A., Lu, Y., Roskin, K. M., Chen, C.-F., et al. (2004). Comparative recombination rates in the rat, mouse, and human genomes. *Genome Research*, 14, 528-538.
- Jones, G. H. (1984). The control of chiasma distribution. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 38, 293-320.



- Jones, L., Rybka, K., & Lukaszewski, A. (2002). The effect of a deficiency and a deletion on recombination in chromosome 1BL in wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 104(6), 1204-1208.
- Joseph, I., Jia, D., & Lustig, A. J. (2005). Ndj1p-dependent epigenetic resetting of telomere size in yeast meiosis. *Current Biology*, 15, 231-237.
- Kao, F.-I., Cheng, Y.-Y., Chow, T.-Y., Chen, H.-H., Liu, S.-M., Cheng, C.-H., et al. (2006). An integrated map of *Oryza sativa* L. chromosome 5. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 112(5), 891-902.
- Kihara, H. (1919). Über cytologysche Studien bei einigen Getreidearten. Mit.I. Speziesbastard des Weizen und Weizenreoggen-bastarde. *Bot. Mag*, 33, 17-38.
- Kihara, H. (1924). Cytologische und genetische Studien bei wichtigen Getreidearten mit besonderer Rücksicht auf das Verhalten der Chromosomen und dei Sterilität in den bastarden. *Mem.Coll.Sci.Kyoto Imp.Univ*, 1, 1-200.
- Kitajima, T. S., Kawashima, S. A., & Watanabe, Y. (2004). The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature*, 427(6974), 510-517.
- Kleckner, N. (1996 ). Meiosis: How could it work? *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 93, 8167-8174.
- Klein, H. L., & Symington, L. S. (2012). Sgs1-The maestro of recombination. *Cell*, 149(2), 257-259.
- Künzel, G., Korzun, L., & Meister, A. (2000). Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics*, 154(1), 397-412.
- Lacadena, J.R. (1981) Genética. Madrid: AGESA. 1.303 p.
- Lake, C. M., & Hawley, R. S. (2012). The molecular control of meiotic chromosomal behavior: Events in early meiotic prophase in *Drosophila* oocytes. *Annual Review of Physiology*, 74, 425-451.
- Lange, J., Pan, J., Cole, F., Thelen, M., Jasin, M., & Keeney, S. (2011). ATM controls meiotic double-strand-break formation. *Nature* 479, 237-240.
- Li, X., & Dawe, R. K. (2009). Fused sister kinetochores initiate the reductional division in meiosis I. *Nat Cell Biol*, 11(9), 1103-1108.

- Li, Y., Bachant, J., Alcasabas, A. A., Wang, Y., Qin, J., & Elledge, S. J. (2002). The mitotic spindle is required for loading of the DASH complex onto the kinetochore. *Genes & Development*, 16(2), 183-197.
- Liu, L., Franco, S., Spyropoulos, B., Moens, P. B., Blasco, M. A., & Keefe, D. L. (2004). Irregular telomeres impair meiotic synapsis and recombination in mice. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 101, 6496-6501.
- Loidl, J., Klein, F., & Scherthan, H. (1994). Homologous pairing is reduced but not abolished in asynaptic mutants of yeast. *Journal of cell biology*, 125 1191-1200.
- López, E., Pradillo, M., Romero, C., Santos, J. L., & Cuñado, N. (2008). Pairing and synapsis in wild type *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Research*, 16, 701-708.
- Lukaszewski, A. J. (1992). A comparison of physical distribution of recombination in chromosome 1R in diploid rye and in hexaploid triticales. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 83, 1048-1053.
- Lukaszewski, A. J. (1995). Physical distribution of translocation breakpoints in homoeologous recombinants induced by the absence of the *Ph1* gene in wheat and triticales. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 90(5), 714-719.
- Lukaszewski, A. J. (2008). Unexpected behaviour of an inverted rye chromosome arm in wheat. *Chromosoma*, 117, 569-578.
- Lukaszewski, A. J., & Curtis, C. A. (1993). Physical distribution of recombination in B-genome chromosomes of tetraploid wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 86(1), 121-127.
- Lukaszewski, A. J., Lapinski, B., & Rybka, K. (2005). Limitations of in situ hybridization with total genomic DNA in routine screening for alien introgressions in wheat. *Cytogenetic and Genome Research*, 109, 373-377.
- Luo, M.-C., Dubcovsky, J., & Dvorak, J. (1996). Recognition of homeology by the wheat *Ph1* locus. *Genetics*, 144(3), 1195-1203.
- MacQueen, A. J., Colaiacovo, M. P., McDonald, K., & Villeneuve, A. M. (2002). Synapsis-dependent and -independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans*. *Genes and development*, 16, 2428-2442.

- MacQueen, A. J., Phillips, C. M., Bhalla, N., Weiser, P., Villeneuve, A. M., & Dernburg, A. F. (2005). Chromosome sites play dual roles to establish homologous synapsis during meiosis in *C. elegans*. *Cell*, 123(6), 1037-1050.
- Maestra, B., Hans de Jong, J., Shepherd, K., & Naranjo, T. (2002). Chromosome arrangement and behaviour of two rye homologous telosomes at the onset of meiosis in disomic wheat-5RL addition lines with and without the *Ph1* locus. *Chromosome Research*, 10, 655-667.
- Maestra, B., & Naranjo, T. (2000). Genome evolution in Triticeae. *Chromosomes Today*, 13, 155-165.
- Mancera, E., Bourgon, R., Brozzi, A., Huber, W., & Steinmetz, L. M. (2008). High-resolution mapping of meiotic crossovers and non-crossovers in yeast. *Nature*, 454(7203), 479-485.
- Martínez, M., Cuñado, N., Carcelen, N., & Romero, C. (2001b). The *Ph1* and *Ph2* loci play different roles in the synaptic behaviour of hexaploid wheat *Triticum aestivum*. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 103, 398-405.
- Martinez, M., Naranjo, T., Cuadrado, C., & Romero, C. (2001a). The synaptic behaviour of *Triticum turgidum* with variable doses of the *Ph1* locus. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 102(5), 751-758.
- Martínez-Pérez, E., Shaw, P., Aragón-Alcaide, L., & Moore, G. (2003). Chromosomes form into seven groups in hexaploid and tetraploid wheat as a prelude of meiosis. *Plant Journal*, 36, 21-29.
- Martínez-Perez, E., Shaw, P., & Moore, G. (2000). Polyploidy induces centromere association. *Journal of cell biology*, 148, 233-238.
- Martínez-Perez, E., Shaw, P., & Moore, G. (2001). The *Ph1* locus is needed to ensure specific somatic and meiotic centromere association. *Nature*, 411, 204-207.
- Martínez-Pérez, E., Shaw, P., Reader, S., Aragón-Alcaide, L., Miller, T. E., & Moore, G. (1999). Homologous chromosome pairing in wheat. *Journal of cell science*, 112, 1761-1769
- Mason-Gamer, R. J., & Kellogg, E. A. (1996). Testing for phylogenetic conflict among molecular data sets in the Tribe Triticeae (Gramineae). *Systematic Biology*, 45(4), 524-545.
- Masterson, J. (1994). Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264, 421-424.

- Matos, J., Blanco, M. G., Maslen, S., Skehel, J. M., & West, S. C. (2011). Regulatory control of the resolution of DNA recombination intermediates during meiosis and mitosis. *Cell*, 147(1), 158-172.
- McKee, B. D. (1996). The license to pair: identification of meiotic pairing sites in *Drosophila*. *Chromosoma*, 105, 135-141.
- McKee, B. D. (2004). Homologous pairing and chromosome dynamics in meiosis and mitosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1677, 165–180.
- McKim, K. S., Howell, A. M., & Rose, A. M. (1988). The effects of translocations on recombination frequency in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 120, 987-1001.
- Mello-Sampayo, T. (1971). Genetic regulation of meiotic chromosome pairing by chromosome 3D of *Triticum aestivum* *Nature*, 230, 23-24.
- Mello-Sampayo, T., & Canas, P. (1973). Suppressors of meiotic chromosome pairing in common wheat. In *Proceedings of the fourth international wheat genetics symposium* (pp. 709-713). Columbia, Missouri.
- Mello-Sampayo, T., & Lorente, R. (1968). The rol of chromosome 3D in the regulation of meiotic pairing in hexaploid wheat. *EWAC Newsletter*, 2, 16-24.
- Mestiri I, Chagué V, Tanguy A-M, Huneau C, Huteau V, Belcram, H., et al. (2010). Newly synthesized wheat allohexaploids display progenitor-dependant meiotic stability and aneuploidy but structural genomic additivity. *New Phytologist*, 186, 86-101.
- Metz, C. W. (1916). Chromosome studies on the Diptera: II. The paired association of chromosomes in the Diptera and its significance. *Journal of Experimental Zoology*, 21, 213- 279.
- Mézard, C. (2006). Meiotic recombination hot spots in plants. *Biochemical Society Transactions*, 34, 531-534.
- Mézard, C., Vignard, J., Drouaud, J., & Mercier, R. (2007). The road to crossovers: plants have their say. *Trends in Genetics*, 23(2), 91-99.
- Mikhailova, E. I., Naranjo, T., Shepherd, K., Wennekes-van Eden, J., Heyting, C., & de Jong, J. H. (1998). The effect of the wheat *Ph1* locus on chromatin organisation and meiotic chromosome pairing analysed by genome painting. *Chromosoma*, 107(5), 339-350.

- Mikhailova, E. I., Sosnikhina, S. P., Kirillova, G. A., Tikhonov, O. A., Smirnov, V. G., Jones, R. N., et al. (2001). Nuclear dispositions of subtelomeric and pericentromeric chromosomal domains during meiosis in asynaptic mutants of rye (*Secale cereale* L.). *Journal of Cell Science*, 114(10), 1875-1882.
- Naranjo, N., & Fernández-Rueda, P. (1996). Pairing and recombination between individual chromosomes of wheat and rye in hybrids carrying the *ph1b* mutation. *Theoretical and Applied Genetics*, 93, 242-248.
- Naranjo, T. (2012). Finding the correct partner: The meiotic courtship. *Scientifica*, *In press*.
- Naranjo, T., & Corredor, E. (2008). Nuclear architecture and chromosome dynamics in the search of the pairing partner in meiosis in plants. *Cytogenetic and Genome Research*, 120, 320-330.
- Naranjo, T., & Lacadena, J. R. (1980). Interaction between wheat chromosomes and rye telomeric heterochromatin on meiotic pairing of chromosome pair 1R of rye in wheat-rye derivatives. *Chromosoma*, 81, 249-261.
- Naranjo, T., & Lacadena, J. R. (1982). C-banding pattern and meiotic pairing in five rye chromosomes of hexaploid triticale. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 61, 233-237.
- Naranjo, T., Lacadena, J. R., & Giraldez, R. (1979). Interaction between wheat and rye genomes on homologous and homoeologous pairing. *Z Pflanzenzüchtg*, 82, 289-305.
- Nicklas, R. B. (1974). Chromosome segregation mechanisms. *Genetics*, 78, 205-213.
- Nicklas, R. B., Ward, S. C., & Gorbsky, G. J. (1995). Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint. *Journal of Cell Biology*, 130, 929-939.
- Niwa, O., Shimanuki, M., & Miki, F. (2000). Telomere-led bouquet formation facilitates homologous chromosome pairing and restricts ectopic interaction in fission yeast meiosis. *The EMBO Journal*, 19, 3831-3840.
- Noguchi, J. (2002). Homolog pairing and two kinds of bouquets in the meiotic prophase of rye, *Secale cereale*. *Genes and Genetic Systems* 77, 39-50.

- Ohta, K., Shibata, T., & Nicolas, A. (1994). Changes in chromatin structure at recombination initiation sites during yeast meiosis. *The EMBO Journal*, 13, 5754-5763.
- Okamoto, M. (1957). Asynaptic effect of chromosome V. *Wheat Inf Serv*, 85, 673-683.
- Page, S. L., & Hawley, S. R. (2003). Chromosome choreography: The meiotic ballet. *Science*, 301, 785-789.
- Page, S. L., & Hawley, S. R. (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annual Reviews Cell and Developmental Biology*, 20, 525-558.
- Pan, J., Sasaki, M., Kniewel, R., Murakami, H., Blitzblau, H. G., Tischfield, S. E., et al. (2011). A hierarchical combination of factors shapes the genome-wide topography of yeast meiotic recombination initiation. *Cell*, 144(5), 719-731.
- Pawlowski, W. P., & Cande, W. Z. (2005). Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends in Cell Biology*, 15(12), 674-681.
- Phillips, C. M., Meng, X., Zhang, L., Chretien, J. H., Urnov, F. D., & Dernburg, A. F. (2009). Identification of chromosome sequence motifs that mediate meiotic pairing and synapsis in *C. elegans*. *Nature cell biology*, 11, 934-942.
- Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., & Lippincott-Schwartz, J. (2007). Meiosis. In *Cell Biology* (Second Edition ed., pp. 902). New York, NY.
- Prieto, P., Santos, A. P., Moore, G., & Shaw, P. (2004a). Chromosomes associate premeiotically and in xylem vessels cells via their telomeres and centromeres in diploid rice (*Oryza sativa*). *Chromosoma*, 112, 300-307.
- Qi, L. L., Friebe, B., & Gill, B. S. (2002). A strategy for enhancing recombination in proximal regions of chromosomes. *Chromosome Research*, 10(8), 645-654.
- Qi, L. L., Friebe, B., Zhang, P., & Gill, B. S. (2007). Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement. *Chromosome Research*, 15, 3-19.
- Quarrie, S. A., Steed, A., Calestani, C., Semikhodskii, A., Lebreton, C., Chinoy, C., et al. (2005). A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring × SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 110(5), 865-880.

- Rabitsch, K. P., Gregan, J., Schleiffer, A., Javerzat, J., Eisenhaber, F., & Nasmyth, K. (2004). Two fission yeast homologs of *Drosophila* Mei-S332 are required for chromosome segregation during meiosis I and II. *Current Biology*, 14(4), 287-301.
- Rhoades, M. M. (1961). Meiosis. In J. Brachet & A. E. Mirsky (Eds.), *The cell: Biochemistry, Physiology, Morphology. Meiosis and Mitosis* (Vol. 3, pp. 1-75). New York: Academic.
- Riley, R. (1960). The diploidization of poliploid wheat. *Heredity*, 15, 407-429.
- Riley, R., & Chapman, V. (1958). Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature*, 128, 713-715.
- Riley, R., & Chapman, V. (1964). The effect of the deficiency of the long arm of chromosome 5B on meiotic pairing in *Triticum aestivum*. *Wheat Inf Serv* 17, 12-15.
- Riley, R., Chapman, V., & Kimber, G. (1959). Genetic control of chromosome pairing in intergeneric hybrids with wheat. *Nature*, 183, 1244-1246.
- Roeder, G. S. (1997). Meiotic chromosomes: it takes two to? tango. *Genes and development*, 11, 2600-2621.
- Ronceret, A., Sheehan, M., Pawlowski, W., Verma, D., & Hong, Z. (2008). Chromosome dynamics in meiosis cell division control in plants. In (Vol. 9, pp. 103-124): Springer Berlin / Heidelberg.
- Saintenac, C., Falque, M., Martin, O. C., Paux, E., Feuillet, C., & Sourdille, P. (2009). Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics*, 181(2), 393-403.
- Santos, J. L., Alfaro, D., Sanchez-Moran, Armstrong, E., S. J, Franklin, F. C. H., & Jones, G. H. (2003). Partial diploidization of meiosis in autotetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 165, 1533-1540.
- Scherthan, H. (2001). A bouquet makes ends meet. *Natural reviews molecular cell*, 6, 975-987.
- Scherthan, H., Eils, R., Trelles-Sticken, E., Dietzel, S., Cremer, T., Walt, H., et al. (1998). Aspects of three-dimensional chromosome reorganization during the onset of human male meiotic prophase. *Journal of Cell Science*, 111(16), 2337-2351.

- Schwacha, A., & Kleckner, N. (1994). Identification of joint molecules that form frequently between homologs but rarely between sister chromatids during yeast meiosis. *Cell*, 76, 51-63.
- Schwarzacher, T. (1997). Three stages of meiotic homologous chromosome pairing in wheat: cognition, alignment and synapsis. *Sexual Plant Reproduction*, 10, 324- 331.
- Sears, E. R. (1966). Nullisomic-tetrasomic combinations in hexaploid wheat. In R. Riley & K. R. Lewis (Eds.), *Chromosome manipulations and Plant Genetics* (pp. 29-45). Oliver & Boyd, Edimburgh.
- Sears, E. R. (1976). Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Annual Review genetics*, 10, 31-51.
- Sears, E. R. (1977). An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 19, 585--593.
- Sears, E. R. (1984). Mutation in wheat that raise the level of homoeologous chromosome pairing. *Proc Gene Manipulation in Plant Improvement. 16th Stadler Genet Symp., Columbia, Mo., Plenum Press, New York and London*, 295-300.
- Sears, E. R., & Okamoto, M. (1958). Intergenomic chromosome relationships in hexaploid wheat. *Proceedings, 10th International Congress of Genetics*, 2, 258-259.
- Smagulova, F., Gregorette, I. V., Brick, K., Khil, P., Camerini-Otero, R. D., & Petukhova, G. V. (2011). Genome-wide analysis reveals novel molecular features of mouse recombination hotspots. *Nature*, 472(7343), 375-378.
- Stack, S. M., & Anderson, L. K. (2001). A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles. *Chromosome Research*, 9(3), 175-198.
- Stack, S. M., & Anderson, L. K. (2002). Crossing over as assessed by late recombination nodules is related to the pattern of synapsis and the distribution of early recombination nodules in maize. *Chromosome Research*, 10, 329-345.
- Stephan, W., & Langley, C. H. (1998). DNA polymorphism in *Lycopersicon* and crossing-over per physical length. *Genetics*, 150(4), 1585-1593.



- Storlazzi, A., Gargano, S., Ruprich-Robert, G., Falque, M., David, M., Kleckner, N., et al. (2010). Recombination proteins mediate meiotic spatial chromosome organization and pairing. *Cell*, 141, 94-106.
- Sung, P., Krejci, L., Van Komen, S., & Sehorn, M. G. (2003). Rad51 recombinase and recombination mediators. *Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 42729-42732.
- Sym, M., & Roeder, G. S. (1994). Crossover interference is abolished in the absence of a synaptonemal complex protein. *Cell*, 79, 283-292.
- Szadkowski, E., Eber, F., Huteau, V., Lodé, M., Huneau, C., Belcram, H., et al. (2010). The first meiosis of resynthesized *Brassica napus*, a genome blender. *New Phytologist*, 186, 102-112.
- Tiang, C., He, Y., & Pawlowski, W. P. (2012). Chromosome organization and dynamics during interphase, mitosis, and meiosis in plants. *Plant Physiology*, 158, 26-34.
- Tóth, A., Rabitsch, K. P., Gálová, M., Schleiffer, A., Buonomo, S. B. C., & Nasmyth, K. (2000). Functional genomics identifies monopolin: A kinetochore protein required for segregation of homologs during meiosis I. *Cell*, 103(7), 1155-1168.
- Trelles-Sticken, E., Adelfalk, C., Loidl, J., & Scherthan, H. (2005). Meiotic telomere clustering requires actin for its formation and cohesin for its resolution. *The Journal of Cell Biology*, 170(2), 213-223.
- Trelles-Sticken, E., Dresser, M. E., & Scherthan, H. (2000). Meiotic telomere protein Ndj1p is required for meiosis- specific telomere distribution, bouquet formation and efficient homologue pairing. *Journal of cell biology*, 151, 95-106.
- Tsai, J., & McKee, B. D. (2011). Homologous pairing and the role of pairing centers in meiosis. *Journal of cell science*, 124, 1955-1963.
- Tsubouchi, T., & Roeder, S. (2005). A synaptonemal complex protein promotes homology-independent centromere coupling. *Science*, 308, 870-873
- Upadhy, M. D., & Swaminathan, M. S. (1967). Mechanism regulating chromosome pairing in *Triticum*. *Biol. Zentralbl. Suppl*, 86, 239-255.
- Villeneuve, A. M. (1994). A cis-acting locus that promotes crossing over between X chromosomes in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 136, 887-902.

- Wang, H. G., Ramey, V. H., Westermann, S., Leschziner, A. E., Welburn, J. P., Nakajima, Y., et al. (2007). Architecture of the Dam1 kinetochore ring complex and implications for microtubule-driven assembly and force-coupling mechanisms. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(8), 721-726.
- Weiss, H., & Maluszynska, J. (2000). Chromosomal rearrangement in autotetraploid plants of *Arabidopsis thaliana*. *Hereditas*, 133, 255-261.
- Wu, J., Mizuno, H., Hayashi-Tsugane, M., Ito, Y., Chiden, Y., Fujisawa, M., et al. (2003). Physical maps and recombination frequency of six rice chromosomes. *The Plant Journal*, 36(5), 720-730.
- Wu, T. C., & Lichten, M. (1994). Meiosis-induced double-strand break sites determined by yeast chromatin structure. *Science*, 263, 515-518.
- Yamamoto, A., & Yasushi, H. (2001). How do meiotic chromosomes meet their homologous partners? Lessons from fission yeast. *Bioessays* 23, 526-533.
- Zakharyevich, K., Tang, S., Ma, Y., & Hunter, N. (2012). Delineation of joint molecule resolution pathways in meiosis identifies a crossover-specific resolvase. *Cell*, 149(2), 334-347.
- Zetka, M. C., & Rose, A. M. (1992). The meiotic behavior of an inversion in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 131, 321-332.
- Zickler, D., & Kleckner, N. (1998). The leptotene-Zygotene transition of meiosis. *Annual Reviews of Genetics*, 32, 619-697.
- Zickler, D., & Kleckner, N. (1999). Meiotic chromosomes: Integrating structure and function. *Annual Reviews of Genetics*, 33, 603-754.

**ANEXOS**

# Chiasma Frequency Is Region Specific and Chromosome Conformation Dependent in a Rye Chromosome Added to Wheat

T. Naranjo<sup>a</sup> N.T. Valenzuela<sup>a</sup> E. Perera<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Genética and <sup>b</sup>Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid, Spain

## Key Words

Chiasmata • Deletion • FISH • Pairing • Rye • Synapsis

## Abstract

In many plant species synapsis starts at, or close to, the chromosome ends and this has been considered to be related to the distal location of chiasmata. In this regard we have studied the meiotic behavior of rye chromosome pair 5R in a wheat background using fluorescence in situ hybridization. The use of different DNA probes allowed the identification of the 2 rye homologues, their centromeres and subtelomeric heterochromatic chromomeres, and the telomeres of all chromosomes in prophase I and metaphase I. Three types of plants were analyzed: homozygotes for the standard chromosome 5R, homozygotes for a deficient chromosome 5R (del5R) with only the proximal 30% of its long arm (del5RL) and heterozygotes. Synapsis of the deficient chromosome arm pair del5RL was completed in most meiocytes at pachytene but the number of chiasmata formed was much lower than in the intact 5RL arm. Deletion facilitated the migration of the telomere of the accompanying chromosome arm 5RS during bouquet organization. This was followed by an increase of synapsis and chiasma frequency in this arm with regard to its counterpart of the intact chromosome. Results demonstrate that crossover formation depends on the DNA

sequence or the chromatin organization of each chromosome region and that homologous alignment, synapsis and chiasma formation may be conditioned by chromosome conformation.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

In sexually reproducing organisms, meiosis is the cellular process which, in each parent, is responsible for the formation of gametes with half the chromosome number. This process compensates for the diploidy produced after fertilization and ensures the maintenance of the correct chromosome number through generations. During meiotic prophase I, homologous chromosomes previously distributed throughout the nucleus [Bass et al., 2000; Maestra et al., 2002] align in intimate contact and form bivalents, which undergo reductional chromosome segregation in the subsequent anaphase I. Three major processes, chromosome pairing (i.e., an interaction of chromosomes that results in the alignment of homologues), synapsis (i.e., the formation of a proteinaceous synaptonemal complex (SC) structure between each homologous pair), and crossing over, are involved in the formation of bivalents. How homologues get into close physical proximity with each other to undergo interaction represents one of the least-understood mechanisms of the meiotic

process [Roeder, 1997; Zickler and Kleckner, 1998; Page and Hawley, 2003; Pawlowski et al., 2003; Pawlowski and Cande, 2005]. Complex networks of interactions between chromosome pairing, synapsis and recombination have been reported [Pawlowski and Cande, 2005]. Chromosome homology search and pairing are largely dependent on the initiation and progression of recombination in fungi, mammals and plants [Loidl et al., 1994; Franklin et al., 1999; Baudat et al., 2000; Peoples et al., 2002; Pawlowski et al., 2003, 2004; Peoples-Holst and Burgess, 2005]. Double-strand DNA break (DSB) formation and progression through the early stage of the repairing process is also necessary for synapsis in species that require recombination for pairing [Bishop et al., 1992; Loidl et al., 1994; Weiner and Kleckner, 1994; Rockmill et al., 1995; Nairz and Klein, 1997; Pittman et al., 1998; Yoshida et al., 1998; Baudat et al., 2000; Celerin et al., 2000; Gerecke and Zolan, 2000; Romanienko and Camerini-Otero, 2000; Grelon et al., 2001; Sung et al., 2003; Tessé et al., 2003; Li et al., 2004]. In organisms such as *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* chromosome pairing and synapsis occur in the absence of DSBs [Dernburg et al., 1998; McKim et al., 1998].

The main steps of the recombination mechanism have been uncovered in yeasts and are conserved in other eukaryotes [Hunter, 2007]. Meiotic recombination is initiated by the formation of a programmed set of DSBs catalyzed by SPO11, a topoisomerase II-related enzyme. The DSBs are repaired by recombination with a chromatid from the homologous chromosome. Completion of repair yields either reciprocal exchange of chromosome arms that flank the break (a crossover) or no exchange of flanking arms (a non-crossover). The majority of DSBs are destined to become non-crossover products. Meiotic recombination events are not randomly distributed in the genome but occur at relatively high frequency in specific regions called hotspots. In *Saccharomyces cerevisiae* DSBs occur preferentially in intergenic regions adjacent to transcription promoters [Gerton et al., 2000]. In *Schizosaccharomyces pombe*, DSBs appear clustered in large intergenic regions not necessarily associated with transcription promoters [Cromie et al., 2007]. DSBs have not been directly detected in other organisms, in which the distribution of recombination events is inferred from mapping of crossovers. Recombination levels vary among species, among chromosomes within species, and between regions within chromosomes in mammals [Jensen-Seaman et al., 2004]. Humans have about twice as much recombination as mouse and rat. The rate of recombination in humans is elevated near telomeres and reduced near centromeres

while in rat and mouse proximity to telomere has less effect on the recombination level.

Data on crossover distribution in plants [reviewed in Mézard et al., 2007] have been obtained either from the construction of genetic maps or from cytological observation of crossovers as chiasmata or as late recombination nodules (LNs). Counting of chiasmata at diakinesis or metaphase I may result in underestimation of the crossover rate as close chiasmata can not be unambiguously identified even in large genomes. LNs observed at pachytene provide a more reliable estimate of crossover number and distribution but visualization of such structures has been achieved only in a few species [Anderson and Stack, 2005]. Other structures called early recombination nodules (ENs) appear at leptotene and persist until early pachytene. ENs are relatively abundant in plants, being up to 20 times more numerous than LNs. Different proteins involved in homologous recombination are components of ENs and a possible role of these structures in searching for DNA homology, synapsis, gene conversion and/or crossover has been suggested [Anderson and Stack, 2005].

Chromosome size and morphology vary between different plant species as well as the distribution of crossovers. In plants with small genomes, such as rice, *Arabidopsis* or tomato, crossovers are distributed along the chromosome arms with a considerable reduction in proximal regions [Stephan and Langley, 1998; Wu et al., 2003; Kao et al., 2005; Mézard, 2006]. In addition, recombination tends to decrease just next to the telomeres in tomato. Among species with large genomes, *Allium fistulosum* shows proximal crossover localization [Jones, 1984] while recombination increases with relative distances from the centromere in many other species, such as maize, wheat or barley [Lukaszewski and Curtis, 1993; Akhunov et al., 2003; Anderson et al., 2004; Künzel et al., 2000]. Rye (*Secale cereale*) is a representative example of species with distal chiasmata that have been used in a number of cytological studies on the frequency and distribution of chiasmata [Lukaszewski, 2008, and references therein]. Many other species among Poaceae show a pattern of chiasma distribution similar to rye. Almost all crossovers detected in the construction of genetic maps of rye, wheat and barley concentrate in the distal half of the chromosome arms [Curtis and Lukaszewski, 1991; Lukaszewski, 1992; Lukaszewski and Curtis, 1993; Gill et al., 1996a, b; Künzel et al., 2000; Saintenac et al., 2009]. The ultrastructural analysis of SC formation demonstrated that the commencement of pairing at distal sites and succession by numerous intercalary initiations is common to many

plant species, regardless of the distribution of chiasmata [Gillies, 1975, 1985; Holm, 1977, 1986; Albin and Jones, 1987; Martínez et al., 2001a, b; López et al., 2008].

In this article we assess the role of proximal and distal regions of chromosome 5R in the initiation of pairing and chiasma formation by studying the effect of a large deficiency (terminal deletion) in the long arm. The homology search mechanism operates correctly in the deficient chromosome arm as pairing and synapsis develop normally. However, the frequency of chiasmata is strongly reduced in this arm suggesting that the formation of crossover or non-crossover products is region specific. An effect of the deletion on the behavior of the short arm shows that chromosome conformation, a feature non-dependent on DNA sequence, is also important for the mechanics of the homology search.

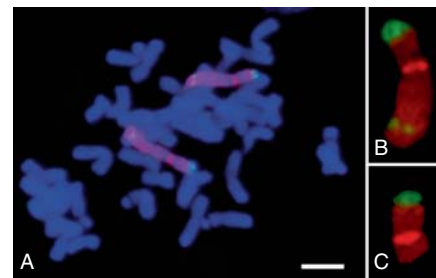
## Materials and Methods

### Plant Material

In a routine control of the addition of chromosome 5R of rye (*S. cereale*) to cv. Chinese Spring of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*,  $2n = 6x = 42$ ), 1 plant was found to be heterozygous for a large deficiency covering 70% of the long arm of chromosome 5R (del5R). Following self-pollination of this heterozygote, deletion homozygotes were selected and either self-crossed or crossed with homozygotes for the standard chromosome. The observations were made in homozygotes of the wheat-5R and wheat-del5R disomic addition lines and in deletion heterozygotes (5R/del5R), all of them with  $2n = 44$  chromosomes. The chromosome constitution of the plants studied was verified by fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of root tips in squashed preparations (fig. 1) as described for meiosis. All plants used were grown in a greenhouse. At meiosis one of the 3 anthers of each flower was checked to establish the meiotic stage and the other 2 were fixed in 3:1 ethanol:acetic acid, and stored at 4°C.

### Fluorescence in situ Hybridization

Fixed anthers were digested in a pectolytic enzyme mixture, transferred to a clean slide, spread and pretreated as previously described [Maestra et al., 2002]. For the study of synapsis the following repeat DNA probes were used: clone pAtT4 containing the *Arabidopsis* telomeric tandem repeat [Richards and Ausubel, 1988], clone pAWRC.1 containing a rye-specific centromere repeat [Franki, 2001], clone pSc74 containing a rye-specific 480-bp tandem repeat [Bedbrook et al., 1980; Cuadrado and Schwarzbacher, 1998] and clone pUCM600 [J.M. Vega, unpubl. data] containing a rye-specific repeat derived from the R173 family [Rogowsky et al., 1992]. Rye chromosomes and the arms being bound at metaphase I were identified using probes pUCM600, pAWRC.1, and pSc74. An analysis of the position of the 5RS chromosome end at leptotene was carried out using the probes pAt74, pAWRC.1 and pSc74. Concentrations of DNA probes in the different hybridization mixes were 5 ng/μl for pAt74 and 10 ng/μl for pAWRC.1, pSc74 and pUCM600.



**Fig. 1.** Standard and deficient rye chromosomes 5R identified by FISH with different DNA probes. Heterochromatic chromomeres (green), centromere (strong red) and the remainder rye chromatin (weak red) were labeled with probes pSc74, pAWRC.1, and pUCM600, respectively. **A** Mitotic metaphase of the standard wheat 5R addition line. Wheat chromosomes are in blue. **B** Normal rye chromosome 5R. **C** Deficient rye chromosome 5R. Bar represents 10 μm.

All clones were labeled by nick translation with biotin-16-dUTP or digoxigenin-11-dUTP. In the analysis of the position of the 5RS ends at leptotene clones pAt74 and pAWRC.1 were labeled with biotin-16-dUTP and clone pSc74 with digoxigenin-11-dUTP. In the analysis of synapsis, clones pAt74 and pAWRC.1 were labeled with digoxigenin-11-dUTP and clones pSc74 and pUCM600 with biotin-16-dUTP. In the identification of the rye chromosome arms at metaphase I, clones pAWRC.1 and pUCM600 were labeled with biotin-16-dUTP and clone pSc74 with digoxigenin-11-dUTP. The digoxigenin-labeled probes were detected with 6–8 ng/μl of the FITC-conjugated anti-digoxigenin antibody (Sigma, St Louis) in 4B (0.5% blocking reagent in 4× SSC) and biotin-labeled probes with 10–15 ng/μl of the Cy3-conjugated avidin (Sigma) in 4B.

### Fluorescence Microscopy and Image Processing

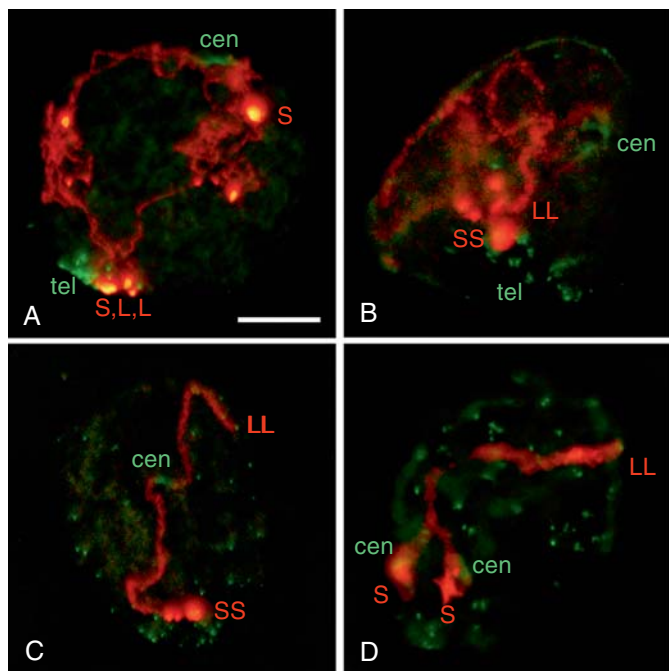
Images of cells were studied under an Olympus BX61 fluorescence microscope equipped with epifluorescence optic, a motorized z-drive, and an Olympus DP71 microscope digital camera controlled by the analysis software analysis pro (Soft Imaging System). Stacks were analyzed and processed using the public domain ImageJ software (National Institutes of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Final images were processed with Adobe Photoshop 7.0 software. ImageJ software was also used to measure in 2D projections the major axis of each nucleus at leptotene as well as the distance of the rye centromeres and 5RS ends to the center of the telomere cluster.

## Results

### The Deletion of 5RL Affects Synapsis on 5RS

To determine whether the loss of the distal 70% of 5RL had some effect on the initiation and progression of synapsis, we analyzed by FISH the arrangement of the rye chromosome pair in pollen mother cells (PMCs) from





**Fig. 2.** Arrangement of the homologous pairs 5R-5R and del5R-del5R at early prophase I. Rye centromeres and telomeres are labeled in green and rye chromosome arms in red. S indicates the end of 5RS and L the end of 5RL and del5RL. **A** PMC at the leptotene-zygotene transition showing 2 L and 1 S end of normal chromosomes 5R at the telomere cluster. The 2 L ends are separated. **B** Homozygous del5R/del5R PMC at mid-zygotene showing a partially disorganized bouquet, synapsis in the distal part of del5RL, intimate association of the distal 5RS chromomeres, and alignment of the 2 subdistal 5RS chromomeres. **C** Homozygous del5R/del5R PMC at late zygotene with complete synapsis of the 2 rye homologues. **D** Homozygous 5R/5R PMC at pachytene with 90% synapsis in 5RL and asynapsis in the remaining chromosome. Bar represents 10  $\mu$ m.

leptotene to pachytene in the normal homozygous line (5R/5R), in the homozygous deletion line (del5R/del5R), and in heterozygotes (5R/del5R). Labeling of telomeres allowed the identification of different early prophase I substages (fig. 2). Telomeres form aggregates at early leptotene, which converge in a tight cluster at the leptotene-zygotene transition. Concomitant with the formation of the bouquet structure, chromatin undergoes a conformational change that results in chromosome elongation [Maestra et al., 2002]. The telomere cluster disintegrates at mid-zygotene as synapsis progresses. Telomeres are dispersed at late zygotene and pachytene, which can be identified by a different degree of chromatin condensation.

**Table 1.** Frequency (%) of PMCs at early leptotene (EL) and at the leptotene-zygotene transition (LLEZ) showing the distally associated homologous arms 5RS or 5RL in 5R/5R and del5R/del5R homozygotes and in 5R/del5R heterozygotes

Line	Stage	5RS	5RL	No. of PMCs analyzed
5R/5R	EL	8.7	19.6	92
	LLEZ	16.4	26.4	110
del5R/del5R	EL	21.2	13.6	66
	LLEZ	21.9	16.4	73
5R/del5R	EL	16.2	0	50
	LLEZ	22.8	0	70

**Table 2.** Frequency (%) of PMCs at middle zygotene (MZ), late zygotene (LZ) and pachytene (P) showing synapsis in more than 90% of the arms 5RS and 5RL (or del5RL) in 5R/5R and del5R/del5R homozygotes and in 5R/del5R heterozygotes

Line	Stage	5RS	5RL/del5RL	No. of PMCs analyzed
5R/5R	MZ	17.6	37.9	108
	LZ	50.8	62.7	59
	P	66.2	87.3	71
del5R/del5R	MZ	41.9	44.3	124
	LZ	84.0	82.0	100
	P	82.0	93.8	97
5R/del5R	MZ	22.6	21.7	106
	LZ	48.4	39.6	91
	P	70.2	70.2	57

In leptotene and early zygotene, the 2 homologous rye chromosomes occupy separate nuclear territories in the majority of PMCs [Maestra et al., 2002]. We concentrated our analysis on the existence of association or not between distal chromosome regions in both arms. The end of the short arm was identified by the presence of a bright heterochromatic knob revealed by the pSc74 probe, which split into 3 chromomeres after chromosome elongation (fig. 2). The end of the long arm lacked heterochromatin knobs both in the standard and deleted chromosomes (fig. 2A). Frequencies of distal association were low in both arms (table 1) and increased with telomere clustering. A higher number of 5RL than 5RS ends appeared close to one another in PMCs of the standard line, but a

higher number of 5RS than 5RL ends associated in the deletion line. No distal association of 5RL was observed in heterozygotes.

Synapsis starts distally and progresses from the end to the center of the chromosome [Corredor et al., 2007]. Progression of synapsis in each chromosome arm through zygotene and pachytene was assessed from the percentage of meiocytes with complete, or at least 90%, synapsis (fig. 2B–D). Table 2 shows the percentage of such PMCs in middle zygotene, late zygotene, and pachytene in the 3 genotypes studied. 5R/5R and del5R/del5R homozygotes reached similar levels of synapsis at pachytene (87.3% and 93.8%, respectively, contingency  $\chi^2$  test = 2.19,  $p > 0.10$ ). However, deletion homozygotes completed synapsis earlier than homozygotes for the standard chromosome as deduced from the percentages of 82.0% and 62.7%, respectively, observed at late zygotene (contingency  $\chi^2$  test = 7.43,  $p < 0.01$ ). Differences in size between the standard 5RL and del5RL arms account for a more rapid completion of synapsis in the deletion line. Heterozygosity for the deletion caused failure of synapsis as deduced from the percentage of 70.2% of PMCs with matched homologous segments of 5RL and del5RL at pachytene. This level of synapsis is lower than that of homozygotes 5R/5R (contingency  $\chi^2$  test = 5.70,  $p < 0.05$ ) or del5R/del5R (contingency  $\chi^2$  test = 15.84,  $p < 0.001$ ).

The 5RS arm, not involved in the deletion, was expected to show a similar behavior in all 3 lines. However, this was not the case. Deletion homozygotes reached a higher level of synapsis than standard homozygotes at any prophase I substage (contingency  $\chi^2$  test = 16.2,  $p < 0.001$  for PMCs at mid-zygotene; contingency  $\chi^2$  test = 20.1,  $p < 0.001$  for PMCs at late zygotene, and contingency  $\chi^2$  test = 5.9,  $p < 0.05$  for PMCs at pachytene). Heterozygotes showed levels of synapsis intermediate between both homozygotes. Thus, the structure, standard or deleted, of the 5RL arm conditions the behavior of 5RS with regard to pairing and synapsis.

#### *Positioning of the 5RS Arms at the Bouquet Conditions Synapsis*

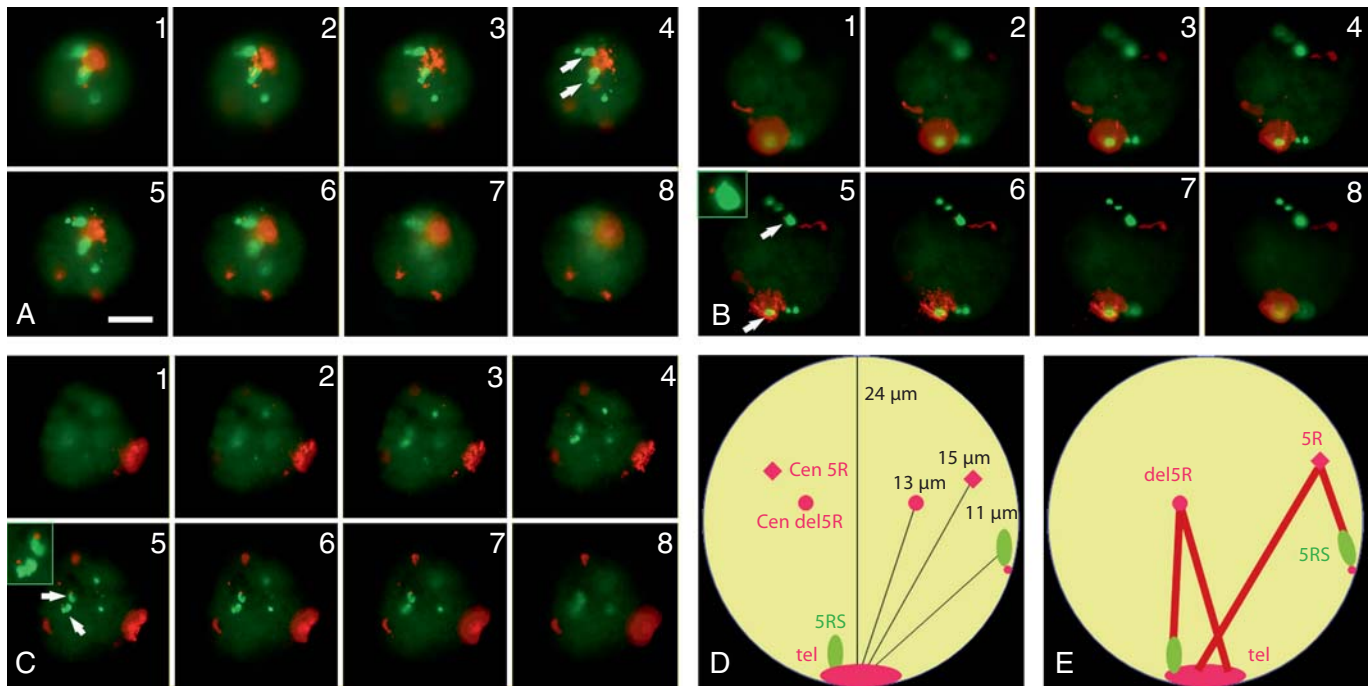
Deletion caused a severe modification of chromosome 5R conformation. While the long arm is twice the size of the short arm in the standard chromosome, del5RL is shorter than 5RS (fig. 1). Obviously, the dimension of the nuclear territory occupied by a given chromosome or chromosome arm in the nucleus at interphase relates to the amount of chromatin that it contains. In nuclei at premeiotic interphase, chromosomes adopt the Rab1 configuration [Maestra et al., 2002] with telomeres located in

one hemisphere opposite the centromere. In such an arrangement the relative position of centromeres and telomeres of 2-armed chromosomes is expected to be affected by the size of their arms. Because telomeres migrate during leptotene and cluster in a small area of the nuclear envelope, their incorporation into the cluster will be conditioned by the distance they have to cover. It is possible that the deletion could affect the positioning of 5RS in the presynaptic nucleus and the incorporation of its end to the telomere pole. To test this hypothesis we analyzed the topological arrangement of the telomere cluster, rye centromeres, and the end of homologues 5RS in 3D section stacks from meiocytes at the leptotene-zygotene transition in the 3 lines studied. The end of chromosome arms 5RS was detected by labeling the adjacent heterochromatic chromomeres with digoxigenin; the rye centromeres and all the telomeres were labeled with biotin (fig. 3A–C). The position of the 5RS telomere close to the adjacent heterochromatic chromomere was apparent in PMCs where this chromosome end was not included in the telomere cluster (fig. 3B, C).

Nuclei studied were grouped in 3 categories: nuclei with both 5RS ends at the telomere cluster, nuclei with only one 5RS end at the telomere pole, and nuclei that kept the two 5RS telomeres out of the telomere cluster. The frequencies of these types of nuclei are given in table 3. Nuclei with the two 5RS ends at the telomere cluster are much more abundant in deletion homozygotes than in the standard line (contingency  $\chi^2$  test = 13.2,  $p < 0.01$ ) or in heterozygotes (contingency  $\chi^2$  test = 17.5,  $p < 0.001$ ). This means that the 5RS telomere of the deficient chromosome reaches more easily the telomere pole than its counterpart of the normal chromosome. A more delayed or disturbed migration of one or both 5RS telomeres followed a reduction in the level of synapsis of this arm and demonstrates the relevance of the presynaptic arrangement of the chromosome ends on homologous pairing.

The physical separation between the telomere cluster and either the 5RS heterochromatic chromomeres or the rye centromeres, as well as the nucleus diameter were measured and scored in 2D projections of meiocytes studied. Average values of such distances are indicated in figure 3D. In PMCs showing 1 or 2 5RS chromosome ends not included in the telomere cluster, distance between such structures was on average 11.1  $\mu\text{m}$  in 5R/5R homozygotes, 10.9  $\mu\text{m}$  in del5R/del5R homozygotes, and 10.5  $\mu\text{m}$  in heterozygotes, that is, almost half the nuclear diameter. The centromere of 5R occupied a more distant position relative to the telomere pole (15  $\mu\text{m}$ ) than the centromere of del5R (13  $\mu\text{m}$ ). Differences in size between





**Fig. 3.** 3D analysis of the topological arrangement of the telomere cluster (red), rye centromeres (red), and 5RS chromomeres (green, arrows) at the bouquet stage. **A** Homozygous 5R/5R PMC showing the 2 distal heterochromatic chromomeres at the telomere pole. **B** Homozygous del5R/del5R PMC with only one 5RS end at the telomere pole, the telomere adjacent to the other 5RS heterochromatic chromomere is shown in the inset. **C** Homozygous 5R/5R

PMC with both 5RS ends separated from the telomere cluster; telomeres are shown in the inset. **D** 2D representation of the nucleus at the bouquet stage showing average distances of rye centromeres and non-clustered heterochromatic chromomeres to the telomere pole. **E** Arrangement of 5R and del5R at the bouquet stage representing a different ability of the 5RS telomere to migrate to the telomere pole. Bar represents 10  $\mu$ m.

**Table 3.** Frequency (%) of PMCs at the leptotene-zygotene transition with 2, only 1 or none 5RS ends at the telomere cluster in 5R/5R and del5R/del5R homozygotes and in 5R/del5R heterozygotes

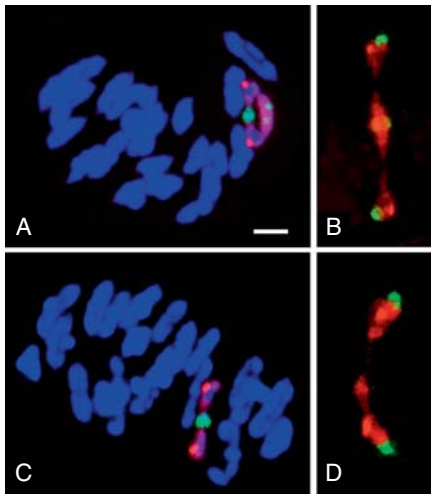
Line	5RS ends at the telomere cluster			No. of PMCs analyzed
	2	1	0	
5R/5R	33.9	45.2	20.9	62
del5R/del5R	64.4	30.5	5.1	59
5R/del5R	27.4	54.8	17.8	62

the arms 5RL and del5RL account for the variation of centromere position in the nucleus at the leptotene-zygotene transition. This result and an easier incorporation of the 5RS telomere of chromosome del5R to the telomere cluster than its counterpart of 5R (fig. 3E) support the conclusion that chromosome conformation conditions

the topology and movements of chromosomes in the pre-synaptic nucleus and hence their pairing and synapsis.

#### *Opposite Effects of the Deletion on Chiasma Frequency of the 2 Arms*

The frequency of chiasmata formed by the rye chromosome pair was estimated from the frequency of bound arms at metaphase I (table 4). There was a severe reduction of the number of chiasmata in the deficient chromosome arm compared to the normal 5RL arm. Chiasmate associations of 5RL reached a frequency of 83.2% in the standard homozygotes while del5RL was bound in only 12% of the PMCs in deletion homozygotes and failed to recombine in the heterozygotes. Chiasmata formed in the intact 5RL arm were located in its distal half and no bivalent with proximal chiasma localization was observed. The few chiasmata formed by del5RL in deletion homozygotes were very distally located (fig. 4). Chiasmate bonds of 5RS showed a subdistal position and their frequency was affected by the deletion. del5R/del5R homo-



**Fig. 4.** Bivalents formed at metaphase I by normal and deficient chromosome 5R (labeling as in figure 1). **A** Homozygous 5R/5R PMC with 21 bivalents of wheat (blue) and the 5R ring bivalent of rye (multicolor). **B** Open bivalent 5R with at least 1 chiasma in the distal half of its long arm. The constriction at the end of the proximal third of 5RL is apparent. **C** Homozygous del5R/del5R PMC with 21 bivalents of wheat (blue) and the rye bivalent with the 5RS arm associated (multicolor). **D** Rye bivalent with a very distal association of the del5RL arm. Bar represents 10  $\mu$ m.

zygotes showed the 5RS arm bound more often than the standard line (contingency  $\chi^2$  test = 6.6,  $p < 0.05$ ) and, in heterozygotes, the frequency of association was intermediate between those of homozygotes. This result is consistent with differences between lines in the level of synapsis at pachytene.

## Discussion

The low level of homologous association between the ends of chromosome pairs 5R-5R, del5R-del5R and 5R-del5R in presynaptic meiocytes is in agreement with previous reports that homologous chromosomes occupy separated nuclear territories at early meiosis [Maestra et al., 2002; Corredor et al., 2007]. From the results on the development of synapsis the conclusion can be drawn that a deficiency of two thirds of the 5RL arm causes no significant modification of synapsis in the remaining proximal third of this arm. This implies that the mechanism responsible for pairing and homologous recognition operates in this proximal segment as in the distal region. Therefore, pairing of 5RL does not depend on sequences located in a specific chromosome region but any

**Table 4.** Frequency (%) of bound arms at metaphase I for the rye chromosome pair in 5R/5R and del5R/del5R homozygotes and in 5R/del5R heterozygotes

Line	Bound arms		No. of PMCs analyzed
	5RS	5RL	
5R/5R	36.4	83.2	173
del5R/del5R	51.7	11.9	118
5R/del5R	44.7	0	123

chromosome stretch seems to be able of participating in the homologous search. In intact chromosomes of wheat and rye, primary initiation of SC formation takes places at or near the telomeres but occurs later at several other sites along the chromosomes [Abirached-Darmency et al., 1983; Holm, 1986]. Alignment of homologues that precedes SC formation should be accomplished in the same way in both primary and secondary synapsis initiation sites.

In most eukaryotes, wheat and rye included, homologous recognition is DSB dependent [Gerton and Hawley, 2005]. Repair of DSBs generates single-strand DNA tails that interact with matching sequences on the homologous chromosome bringing homologous chromosomes into alignment during leptotene. The distribution of ENs in SCs of different plant species suggests some non-crossover recombination activity in proximal regions [Anderson and Stack, 2005]. In budding yeasts, in spite of the fact that crossover formation is largely absent in pericentromeric regions, DSBs are produced there [Blitzblau et al., 2007; Buhler et al., 2007]. High-resolution mapping of meiotic crossover and non-crossover events has shown a close correspondence between the DSB map and recombination repair map [Mancera et al., 2008]. Such a correspondence supports the idea that DSBs produced in pericentromeric regions are also repaired via inter-homologous interaction. All these data suggest that, in chromosome del5R with a large deficiency, the homologous search depends on repair of proximally located DSBs.

Heterozygosity for the deletion causes failure of synapsis in the shared proximal third of 5RL. Previous studies on homo- and heterozygous deletion stocks revealed that homology at the chromosome ends is crucial for initiating pairing that leads to the formation of a chiasmate association at metaphase I [Curtis et al., 1991; Endo et al., 1991; Lukaszewski, 1995; Gill et al., 1997; Jones et al., 2002; Qi et al., 2002]. In such a situation, pairing and syn-

apsis progress from the end to the center of the chromosome [Corredor et al., 2007]. Although telomere clustering brings the ends of deficient and standard chromosomes into close proximity, the lack of homology in the subtelomeric regions hinders matching of shared homologous segments and causes failure of synapsis even in the case that the lost segment was small. Synapsis between segments shared by intact 5RL and del5RL in deletion heterozygotes could be either an extension of synapsis in the adjacent 5RS arm or the result of chance encounters produced because of the active chromosome movement generated in this prophase I stage [Conrad et al., 2008].

Although removal of the distal 70% of 5RL caused no disturbance of synapsis of the remaining proximal segment in del5R/del5R homozygotes, crossover frequency was severely affected. Only 11.9% of meiocytes at metaphase I showed a chiasmate bond of del5RL compared to 83.2% of the intact 5RL arm. The deletion effect was even higher in heterozygotes where no chiasmate association between del5RL and 5RL was observed. Strong reduction of chiasma frequency is the common situation for deficiency heterozygotes in wheat but the amount of chiasmate association is restored to a normal level in deficient chromosome homozygotes [Curtis et al., 1991; Endo et al., 1991; Lukaszewski, 1995; Gill et al., 1997; Jones et al., 2002; Qi et al., 2002]. The construction of genetic maps in combination with metaphase I pairing data has demonstrated that the low recombination frequency of intercalary regions of wheat chromosome 5BL can be increased by placing them at the chromosome ends by means of a deficiency [Jones et al., 2002; Qi et al., 2002]. In the deficient chromosome arm del5BL with distal 41% missing, the increase in recombination concerns mainly its very distal part and does not affect the more proximal region. In the intact chromosome arm 5RL, chiasmata were confined to the distal half; no chiasma was observed at its proximal third, which appeared separated from the crossover(s) region by an apparent secondary constriction (fig. 4C). Some crossovers were formed in the very distal part of the deficient arm del5RL, but recombination frequency did not reach the level observed for wheat chromosomes with smaller deficiencies. This result demonstrates that the position on the centromere-telomere axis is not sufficient to explain the scarce proximal recombination. A similar conclusion was recently reported from the effect of an inversion in rye chromosome arm 1RL [Lukaszewski, 2008]. Thus, a genetic mechanism must be present that controls crossover formation in specific regions. The absence of proximal chiasmata should be imposed by factors such as the DNA sequence or chro-

matin organization in this part of the chromosome. Accordingly, extensive physical mapping studies in wheat have revealed differences in gene density along the telomere-centromere axis. Proximal regions are low in recombination and mainly devoid of genes while distal high-recombination regions are gene rich [Gill et al., 1993, 1996a, b]. Therefore, the possibilities of manipulating recombination by chromosome rearrangement that change the segment position decrease strongly with the proximity to the centromere.

The behavior of 5RS in leptotene accounts for differences in the level of synapsis and chiasma frequency between homozygotes for the standard and deleted chromosomes. Migration of the 5RS telomere in the intact chromosome was delayed or disturbed more often than in the deficient chromosome. A higher ability of the telomere of 5RS to migrate to the telomere cluster in del5R/del5R homozygotes was accompanied by an increase in the degree of synapsis and chiasma frequency. Consistent with this, heterozygotes showed the highest frequency of nuclei with only one 5RS end at the telomere cluster and intermediate levels of synapsis and chiasma frequency in this arm. Variable effects of the incorporation of telomere 5RS to the telomere pole could arise from changes in chromosome architecture imposed by the length of the accompanying arm, del5RL or 5RL, which varied in the ratio of 1/3. In fact, the centromere of chromosome 5R was more separated from the telomere pole than the centromere of del5R. This means that differences in chiasma frequency between the short and the long arm of a 2-armed chromosome are not derived only, as previously assumed, from differences in their length but also from the chromosome topology at the bouquet configuration.

Proper segregation of 2 homologues at anaphase I requires they have formed at least 1 chiasma in prophase I. Not all meiocytes of normal homozygotes formed at least 1 chiasma in 5RL. This arm was unpaired in 16.8% of metaphase I PMCs. This and the low frequency of chiasmate association of 5RS yielded a percentage of 14% PMCs (result not shown) with 2 univalents at metaphase I. The relatively high level of this meiotic irregularity affects the transmission of chromosome 5R and, therefore, generates aneuploidy among the progeny. This suggests that the negative effect of chromosome conformation on chiasma formation might have evolutionary implications on the chromosome structure of species unless they develop some correction mechanism. This seems to be the case in rye. In the absence of wheat chromosomes, chromosome 5R shows regular pairing at metaphase I, and the same applies to other rye chromosomes [Naranjo et al., 1979;

Naranjo and Lacadena, 1980, 1982]. The presence of wheat chromosomes affects metaphase I pairing of rye chromosome arms carrying subtelomeric heterochromatin more than pairing of arms lacking it [Naranjo and Lacadena, 1980, 1982, and references therein]. This suggests that subtelomeric heterochromatic chromomeres could be responsible for failure of synapsis and chiasma formation in any 5RS arm pair. The high degree of condensation and the size of heterochromatic chromomeres could generate resistance to movement of the adjacent telomere during leptotene and affect synapsis and recombination. Such a resistance would be the same for deletion and standard

homozygotes, but the architecture of the normal chromosome represents an additional factor conditioning the arrangement of 5RS in the bouquet structure.

## Acknowledgements

This work has been supported by grants BFU2007-66544 from Dirección General de Investigación, Ministerio de Educación y Ciencia of Spain, and CONICYT for PhD study from Chile Government. We would like to thank P. Landgridge, A. Cuadrado and J.M. Vega for kindly supplying the clones pAWRC.1, pSc74, and pUCM600, respectively.

## References

- Abirached-Darmency M, Zickler D, Cauderon Y: Synaptonemal complex and recombination nodules in rye (*Secale cereale*). *Chromosoma* 88:299–306 (1983).
- Akhunov ED, Goodyear AW, Geng S, Qi LL, Echalié B, et al: The organization and rate of evolution of wheat genomes are correlated with recombination rates along chromosome arms. *Genome Res* 13:753–763 (2003).
- Albini SM, Jones GH: Synaptonemal complex spreading in *Allium cepa* and *A. fistulosum*. I. The initiation and sequence of pairing. *Chromosoma* 95:324–338 (1987).
- Anderson LK, Stack SM: Recombination nodules in plants. *Cytogenet Genome Res* 109:198–204 (2005).
- Anderson LK, Salameh N, Bass HW, Harper LC, Cande WZ, et al: Integrating genetic linkage maps with pachytene chromosome structure in maize. *Genetics* 166:1923–1933 (2004).
- Bass HW, Riera-Lizarazu O, Ananiev EV, Bordoli SJ, Rines HW, et al: Evidence for the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. *J Cell Sci* 113:1033–1042 (2000).
- Baudat F, Manova K, Yuen JP, Jasin M, Keeney S: Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell* 6:989–998 (2000).
- Bedbrook JR, Jones J, O'Dell M, Thompson RD, Flavell RB: A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell* 19:545–560 (1980).
- Bishop DK, Park D, Xu L, Kleckner N: *DMC1*: A meiosis-specific yeast homolog of *E. coli recA* required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 69:439–456 (1992).
- Blitzblau HG, Bell GW, Rodríguez J, Bell SP, Hochwagen A: Mapping of meiotic single-stranded DNA reveals double-strand-break hotspots near centromeres and telomeres. *Curr Biol* 17:2003–2012 (2007).
- Buhler C, Borde V, Lichten M: Mapping meiotic single-strand DNA reveals a new landscape of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol* 5:e324 (2007).
- Celerin M, Merino ST, Stone JE, Menzie AM, Zolan ME: Multiple roles of Spo11 in meiotic chromosome behavior. *EMBO J* 19:2739–2750 (2000).
- Conrad MN, Lee CY, Chao G, Shinohara M, Kosaka H, et al: Rapid telomere movement in meiotic prophase is promoted by NDJ1, MPS3, and CSM4 and is modulated by recombination. *Cell* 173:1185–1187 (2008).
- Corredor E, Lukaszewski AJ, Pachón P, Allen DC, Naranjo T: Terminal regions of wheat chromosomes select their pairing partners in meiosis. *Genetics* 177:699–706 (2007).
- Cromie GA, Hyppa RW, Cam HP, Farah JA, Grewal SI, et al: A discrete class of intergenic DNA dictates meiotic DNA break hotspots in fission yeast. *PLoS Genet* 3:e141 (2007).
- Cuadrado A, Schwarzscher T: The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. *Chromosoma* 107:587–594 (1998).
- Curtis CA, Lukaszewski AJ: Genetic linkage between C-bands and storage protein genes in chromosome 1B of tetraploid wheat. *Theor Appl Genet* 81:245–252 (1991).
- Curtis CA, Lukaszewski AJ, Chrzastek M: Metaphase-I pairing of deficient chromosomes and genetic mapping of deficiency breakpoints in wheat. *Genome* 34:553–560 (1991).
- Dernburg AF, McDonald K, Moulder G, Barstead R, Dresser M, et al: Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 94:387–398 (1998).
- Endo TR, Mukai Y, Yamamoto M: Physical mapping of a male-fertility gene of common wheat. *Jpn J Genet* 66:201–205 (1991).
- Franki MG: Identification of Bilby, a diverged centromeric Ty1-copia retrotransposon family from cereal rye (*Secale cereale* L.). *Genome* 44:266–274 (2001).
- Franklin AE, McElver J, Sunjevaric I, Rothstein R, Bowen B, Cande WZ: Three-dimensional microscopy of the Rad51 recombination protein during meiotic prophase. *Plant Cell* 11:809–824 (1999).
- Gerecke EE, Zolan ME: An *mre11* mutant of *Coprinus cinereus* has defects in meiotic chromosome pairing, condensation and synapsis. *Genetics* 154:1125–1139 (2000).
- Gerton JL, Hawley RS: Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nat Rev Genet* 6:477–487 (2005).
- Gerton JL, DeRisi J, Shroff R, Lichten M, Brown PO, et al: Global mapping of meiotic recombination hotspots and coldspots in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11383–11390 (2000).
- Gill BS, Gill KS, Friebe B, Endo TR: Expanding genetic maps: reevaluation of the relationship between chiasmata and crossovers. *Chromosomes Today* 12:283–298 (1997).
- Gill KS, Gill BS, Endo TR: A chromosome region specific mapping strategy reveals gene-rich telomeric ends in wheat. *Chromosoma* 102:374–381 (1993).
- Gill KS, Gill BS, Endo TR, Boyko EV: Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 5 of wheat. *Genetics* 143:1001–1012 (1996a).
- Gill KS, Gill BS, Endo TR, Boyko EV: Identification and high density mapping of gene-rich regions in chromosome group-1 of wheat. *Genetics* 143:1001–1012 (1996b).
- Gillies CB: An ultrastructural analysis of chromosome pairing in maize. *C R Trav Lab Carlsberg* 40:135–161 (1975).
- Gillies CB: An electron microscopical study of synaptonemal complex formation at zygotene in rye. *Chromosoma* 92:165–175 (1985).
- Grelon M, Vezon D, Gendrot G, Pelletier G: AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J* 20:589–600 (2001).



- Holm PB: Three-dimensional reconstruction of chromosome pairing during the zygotene stage of meiosis in *Lilium longiflorum* (Thunb.). *Carlsberg Res Commun* 42:103–151 (1977).
- Holm PB: Chromosome pairing and chiasma formation in allohexaploid wheat: *Triticum aestivum* analyzed by spreading of meiotic nuclei. *Carlsberg Res Commun* 51:239–294 (1986).
- Hunter N: Meiotic recombination, in Aguilera A, Rothstein R (eds): *Molecular Genetics of Recombination*, pp 381–442 (Springer-Verlag, Berlin 2007).
- Jensen-Seaman MI, Furey TS, Payseur BA, Lu Y, Roskin KM, et al: Comparative recombination rates in the rat, mouse, and human genomes. *Genome Res* 14:528–538 (2004).
- Jones GH: The control of chiasma distribution. *Symp Soc Exp Biol* 38:293–320 (1984).
- Jones LE, Rybka K, Lukaszewski AJ: The effect of a deficiency and a deletion on recombination in chromosome 1BL in wheat. *Theor Appl Genet* 104:1204–1208 (2002).
- Kao FI, Cheng YY, Chow TY, Chen HH, Liu SM, et al: An integrated map of *Oryza sativa* L. chromosome 5. *Theor Appl Genet* 112:892–902 (2005).
- Künzel G, Korzun L, Meister A: Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics* 154:397–712 (2000).
- Li W, Chen C, Markmann-Mulisch U, Timofejeva L, Schmelzer E, et al: The *Arabidopsis AtRAD51* gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:10596–10601 (2004).
- Loidl J, Klein F, Scherthan H: Homologous pairing is reduced but not abolished in asynaptic mutants of yeast. *J Cell Biol* 125:1191–1200 (1994).
- López E, Pradillo M, Romero C, Santos JL, Cuiñado N: Pairing and synapsis in wild type *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res* 16: 701–708 (2008).
- Lukaszewski AJ: A comparison of physical distribution of recombination in chromosome 1R in diploid rye and in hexaploid triticale. *Theor Appl Genet* 83:1048–1053 (1992).
- Lukaszewski AJ: Physical distribution of translocation breakpoints in homoeologous recombinants induced by the absence of the *Ph1* gene in wheat and triticale. *Theor Appl Genet* 90:714–719 (1995).
- Lukaszewski AJ: Unexpected behaviour of an inverted rye chromosome arm in wheat. *Chromosoma* 117:569–578 (2008).
- Lukaszewski AJ, Curtis CA: Physical distribution of recombination in B-genome chromosomes of tetraploid wheat. *Theor Appl Genet* 86:121–127 (1993).
- Maestra B, De Jong JH, Shepherd K, Naranjo T: Chromosome arrangement and behaviour of two rye telosomes at the onset of meiosis in disomic wheat-5RL addition lines with and without the *Ph1* locus. *Chromosome Res* 10: 655–667 (2002).
- Mancera E, Bourgon R, Brozzi A, Huber W, Steinmetz LM: High-resolution mapping of meiotic crossovers and non-crossovers in yeast. *Nature* 454:479–485 (2008).
- Martínez M, Cuiñado N, Carcelen N, Romero C: The *Ph1* and *Ph2* loci play different roles in the synaptic behaviour of hexaploid wheat *Triticum aestivum*. *Theor Appl Genet* 103: 398–405 (2001a).
- Martínez M, Naranjo T, Cuadrado C, Romero C: The synaptic behaviour of *Triticum turgidum* with variable doses of the *Ph1* locus. *Theor Appl Genet* 102:751–758 (2001b).
- McKim KS, Green-Marroquin BL, Sekelsky JJ, Chin G, Steinberg C, et al: Meiotic synapsis in the absence of recombination. *Science* 279:876–878 (1998).
- Mézard C: Meiotic recombination hot spots in plants. *Biochem Soc Trans* 34:531–534 (2006).
- Mézard C, Vignard J, Drouaud J, Mercier R: The road to crossovers: plants have their say. *Trends Genet* 23:91–99 (2007).
- Nairz K, Klein F: *mre11S* – a yeast mutation that blocks double-strand-break processing and permits nonhomologous synapsis in meiosis. *Genes Dev* 11:2272–2290 (1997).
- Naranjo T, Lacadena JR: Interaction between wheat chromosomes and rye telomeric heterochromatin on meiotic pairing of chromosome pair 1R of rye in wheat-rye derivatives. *Chromosoma* 81:249–261 (1980).
- Naranjo T, Lacadena JR: C-banding pattern and meiotic pairing in five rye chromosomes of hexaploid triticale. *Theor Appl Genet* 61: 233–237 (1982).
- Naranjo T, Lacadena JR, Giráldez R: Interaction between wheat and rye genomes on homologous and homeologous pairing. *Z Pflanzenzüchtg* 82:289–305 (1979).
- Page SL, Hawley RS: Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301:785–789 (2003).
- Pawlowski WP, Cande WZ: Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends Cell Biol* 15:664–681 (2005).
- Pawlowski WP, Golubovskaya IN, Cande WZ: Altered nuclear distribution of recombination protein RAD51 in maize mutants suggests the involvement of RAD51 in meiotic homology recognition. *Plant Cell* 15:1807–1816 (2003).
- Pawlowski WP, Golubovskaya IN, Timofejeva L, Meeley RB, Sheridan WF, Cande WZ: Coordination of meiotic recombination, pairing, and synapsis by PHS1. *Science* 303:89–92 (2004).
- Peoples TL, Dean E, González O, Lambourne L, Burgess SM: Close, stable homolog juxtaposition during meiosis in budding yeast is dependent on meiotic recombination, occurs independently of synapsis, and is distinct from DSB-independent pairing contacts. *Genes Dev* 16:1682–1695 (2002).
- Peoples-Holst TL, Burgess SM: Multiple branches of the meiotic recombination pathway contribute independently to homolog pairing and stable juxtaposition during meiosis in budding yeast. *Genes Dev* 19:863–874 (2005).
- Pittman DL, Cobb J, Schimenti KJ, Wilson LA, Cooper DM, et al: Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for *Dmcl1*, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* 1:697–705 (1998).
- Qi LL, Friebe B, Gill BS: A strategy for enhancing recombination in proximal regions of chromosomes. *Chromosome Res* 10:645–654 (2002).
- Richards EJ, Ausubel SM: Isolation of a higher eukaryotic telomere sequence from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53:127–136 (1988).
- Rockmill B, Sym M, Scherthan H, Roeder GS: Roles for two RecA homologs in promoting meiotic chromosome synapsis. *Genes Dev* 9: 2684–2695 (1995).
- Roeder GS: Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev* 11:2600–2621 (1997).
- Rogowsky PM, Liu JY, Manning S, Taylor C, Langridge P: Structural heterogeneity in the R173 family of rye-specific repetitive DNA sequences. *Plant Mol Biol* 20:93–102 (1992).
- Romanienko PJ, Camerini-Otero RD: The mouse *Spo11* gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell* 6:975–987 (2000).
- Saintenac C, Falque M, Martin OC, Paux E, Feuillet C, et al: Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics* 181:393–403 (2009).
- Stephan W, Langley CH: DNA polymorphism in *Lycopersicon* and crossing-over per physical length. *Genetics* 150:1585–1593 (1998).
- Sung P, Krejci L, Komen SV, Sehorn MG: Rad51 recombinase and recombination mediators. *J Biol Chem* 278:42729–42732 (2003).
- Tessé S, Storlazzi A, Kleckner N, Gargano S, Zickler D: Localization and roles of Ski8p protein in *Sordaria* meiosis and delineation of three mechanistically distinct steps of meiotic homolog juxtaposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12865–12870 (2003).
- Weiner BM, Kleckner N: Chromosome pairing via multiple interstitial interactions before and during meiosis in yeast. *Cell* 77:977–991 (1994).
- Wu J, Mizumo H, Hayashi-Tsugane M, Ito Y, Chiden Y, et al: Physical map and recombination frequency of six rice chromosomes. *Plant J* 36:720–730 (2003).
- Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, Habu T, Nishimune Y, et al: The mouse *RecA*-like gene *Dmcl1* is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell* 1: 707–718 (1998).
- Zickler D, Kleckner N: The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet* 32: 619–697 (1998).

# Dynamics of Rye Chromosome 1R Regions with High or Low Crossover Frequency in Homology Search and Synapsis Development

Nohelia T. Valenzuela<sup>1</sup>, Esther Perera<sup>2</sup>, Tomás Naranjo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid, Spain, <sup>2</sup> Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid, Spain

## Abstract

In many organisms, homologous pairing and synapsis depend on the meiotic recombination machinery that repairs double-strand DNA breaks (DSBs) produced at the onset of meiosis. The culmination of recombination via crossover gives rise to chiasmata, which locate distally in many plant species such as rye, *Secale cereale*. Although, synapsis initiates close to the chromosome ends, a direct effect of regions with high crossover frequency on partner identification and synapsis initiation has not been demonstrated. Here, we analyze the dynamics of distal and proximal regions of a rye chromosome introgressed into wheat to define their role on meiotic homology search and synapsis. We have used lines with a pair of two-armed chromosome 1R of rye, or a pair of telocentrics of its long arm (1RL), which were homozygous for the standard 1RL structure, homozygous for an inversion of 1RL that changes chiasma location from distal to proximal, or heterozygous for the inversion. Physical mapping of recombination produced in the ditelocentric heterozygote (1RL/1RL<sub>inv</sub>) showed that 70% of crossovers in the arm were confined to a terminal segment representing 10% of the 1RL length. The dynamics of the arms 1RL and 1RL<sub>inv</sub> during zygotene demonstrates that crossover-rich regions are more active in recognizing the homologous partner and developing synapsis than crossover-poor regions. When the crossover-rich regions are positioned in the vicinity of chromosome ends, their association is facilitated by telomere clustering; when they are positioned centrally in one of the two-armed chromosomes and distally in the homolog, their association is probably derived from chromosome elongation. On the other hand, chromosome movements that disassemble the bouquet may facilitate chromosome pairing correction by dissolution of improper chromosome associations. Taken together, these data support that repair of DSBs via crossover is essential in both the search of the homologous partner and consolidation of homologous synapsis.

**Citation:** Valenzuela NT, Perera E, Naranjo T (2012) Dynamics of Rye Chromosome 1R Regions with High or Low Crossover Frequency in Homology Search and Synapsis Development. PLoS ONE 7(4): e36385. doi:10.1371/journal.pone.0036385

**Editor:** Raymund J. Wellinger, Université de Sherbrooke, Canada

**Received:** February 10, 2012; **Accepted:** April 1, 2012; **Published:** April 30, 2012

**Copyright:** © 2012 Valenzuela et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work has been supported by grants: BFU2007-66544 from Dirección General de Investigación, Ministerio de Educación y Ciencia of Spain, and CONICYT for PhD study from the Chile Government. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: toranjo@bio.ucm.es

## Introduction

Chiasma formation between homologous chromosomes at prophase I of meiosis is indispensable for proper reduction of the chromosome number at anaphase I and, hence, for the efficient production of gametes. Chiasmata are formed after culmination of three major processes initiated in early prophase I, homologous pairing (i.e., an interaction of chromosomes that results in the alignment of homologues), synapsis (i.e., the formation of a proteinaceous synaptonemal complex structure between each homologous pair), and crossing over. A crossover and a non-crossover (non-reciprocal exchange) represent the two possible outcomes in the pathway that the homologous recombination machinery follows to repair one DSB generated by the topoisomerase II related enzyme SPO11 at the initiation of meiosis. The majority of DSBs are destined to become non-crossover products; the few that are crossovers create chiasmata forming mechanical bonds between homologues. Crossover and non-crossover pathways diverge at the leptotene-zygotene transi-

tion, prior to the formation of extensive strand-exchange intermediates [1].

At the onset of meiosis, homologous chromosomes occupy in many species separate territories [2]. To become paired, they need to be brought into sufficient physical proximity to make feasible the interactions that lead to homology recognition and the establishment of some form of bonds. In the course of leptotene, in most organisms studied, telomeres attach to the inner nuclear envelope and cluster to form the so-called bouquet. Because of the coincidence of synapsis initiation and telomere clustering, the bouquet configuration is regarded as facilitating pairing and synapsis of homologous chromosomes by bringing their telomeres into a close proximity [3–9]. Complex networks of interactions between chromosome pairing, synapsis and recombination have been reported [10]. The chromosome homology search, pairing and synapsis are largely dependent on the initiation and progression of recombination in fungi, mammals and plants. However, it is not well understood whether the crossover and non-crossover pathways play a similar role or not in homologous pairing and synapsis.

Meiotic recombination events are non-randomly distributed in the genome, largely because DSBs are more likely to form in some genome regions than in others [11–12]. Regions where DSBs occur at relatively high frequency are called recombination hot-spots. A high-resolution map of meiotic DSBs across the genome has been constructed only in two eukaryotes, *Saccharomyces cerevisiae* [13] and mice [14]. In both species, the DSB map displays reasonable agreement with the crossover distribution map. In plants, studies on the distribution of crossovers [15] have been based either on genetic maps or on cytological approaches providing the physical localization of chiasmata or late recombination nodules. These studies have shown that in many plant species with large genomes, such as maize, wheat, barley or rye, the crossover frequency increases with the relative distances from the centromere [16–20]. Chiasmata are concentrated in the distal part of most chromosomes in these species. Likewise, chromosome pairing and assembly of the synaptonemal complex are initiated usually at distal sites and succeeded by numerous intercalary initiations [21–23].

Chromosome rearrangements such as deletions or inversions, that change the position of chromosome segments on the telomere-centromere axis, are a useful tool in unraveling the role of different chromosome regions in homologous pairing, synapsis and recombination. Heterozygosity for the loss of long terminal segments in wheat chromosomes causes a strong reduction in chiasma frequency in the affected chromosome arm. However, homozygosity for the deletion returns to normal the amount of chiasmata formed [24–28]. This behavior of truncated wheat chromosomes suggested that any chromosome region was capable of forming chiasmata when positioned close to the chromosome end. However, a different conclusion was reached from a truncated rye chromosome in a wheat background. The strong reduction of chiasmata caused by a deletion covering the distal 70% of the long arm of rye chromosome 5R (5RL) in both homozygotes and heterozygotes demonstrated that chiasma frequency is region-specific [29]. In spite of the few chiasmata formed by del5RL, synapsis in homozygotes was normal, suggesting different implications of the region-specific DNA sequences in crossover and synapsis.

That it is not the position but the DNA sequence, or chromatin organization, normally present in the distal part of a given chromosome arm that determines the crossover formation, was also demonstrated for the long arm of chromosome 1R (1RL). An inversion covering 90–95% of the 1RL arm in a wheat background was accompanied by a parallel change in the pattern of chiasma distribution [20]. Inversion homozygotes and heterozygotes produced only proximal chiasmata in the inverted arm. However, the behavior of normal and inverted chromosomes 1RL in early meiotic stages was not reported.

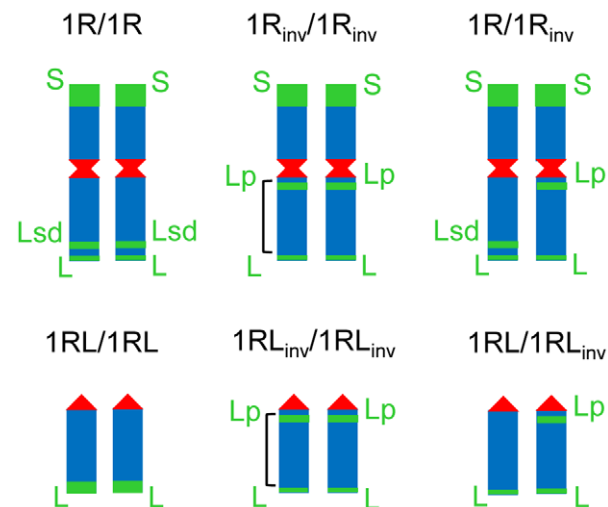
The inversion of 1RL represents an excellent chromosome construct to study the role that distal crossover-rich and proximal crossover-poor regions play on homologous partner identification and the initiation and development of synapsis. In contrast with deletions, no chromosome region is lost in the inverted chromosome, which permits to analyze the behavior of different segments in the same cells. In addition, crossover-rich and crossover-poor regions adopt a balanced positioning in heterozygotes; they are located distally in one chromosome and proximally in the homolog, hence avoiding a possible effect of the proximity to the telomere. Rye chromosomes introgressed into wheat can be visualized by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rye genomic DNA probes or with pUCM600, a rye specific DNA clone [30]. Furthermore, the distal and subdistal C-heterochromatin bands that chromosome 1R usually carries, as well as the

centromere, can also be visualized by FISH [29]. In this article, we examine the role that distal crossover-rich and proximal crossover-poor regions of 1RL play in the search of the homologous partner and synapsis through modifications, that the inversion of this arm, caused in the dynamics of such regions in early and mid prophase I. We report on the physical location of crossovers in a heterozygote for the inversion. A majority of crossovers in the arm are formed in a very small region that in a normal chromosome is flanked by a subdistal chromomere and the telomere. In the inverted arm, this region is flanked by a proximal chromomere and the centromere. We conclude that, regardless of their position on the telomere-centromere axis, the chromosome regions with high crossover frequency appear to provide more opportunity for homologous encounters and synapsis than those with low crossover capabilities.

## Results

### Rye chromosome markers

The structure of mitotic rye chromosomes in each of the six wheat-rye introgressed lines studied is presented in Figure 1. Green bands represent C-heterochromatin chromomeres, which were detected by FISH using clone pSc74. The centromere was detected with clone pAWRC.1 while clone pUCM600 was used to label the remaining rye chromosome regions. The short arm of chromosome 1R carries the largest heterochromatic chromomere (S), and the long arm two smaller chromomeres that are located distally (L) and subdistally (Lsd). Differences in the hybridization signal size identified the small distal and large subdistal chromomere. In the inverted chromosome the subdistal chromomere relocates to the proximity of the centromere (Lp). The ditelocentric heterozygote (1RL/1RL<sub>inv</sub>) lacks the subdistal signal in the 1RL chromosome, which indicates loss of the subdistal chromomere; the standard ditelocentric line (1RL/1RL) carries only a distal large-sized chromomere.



**Figure 1. The structure of the rye chromosome pair studied in a wheat background.** Disomic introgressed wheat-rye lines for both chromosome 1R and the telocentric of its long arm (1RL) were homozygous for the standard structure (1R/1R and 1RL/1RL) homozygous for a pericentric inversion of its long (1R<sub>inv</sub>/1R<sub>inv</sub> and 1RL<sub>inv</sub>/1RL<sub>inv</sub>) or heterozygotes (1R/1R<sub>inv</sub> and 1RL/1RL<sub>inv</sub>). The approximated size of the inversion is indicated in homozygotes. Centromeres (red) and C-heterochromatin blocks S, Lp, Lsd and L (green) are rye-specific chromosome markers identified by FISH.  
doi:10.1371/journal.pone.0036385.g001

### The position of crossovers in the 1RL arm

At metaphase I (MI) rye chromosomes were paired into bivalents in most pollen mother cells (PMCs) (Fig. 2). Some PMCs with two rye univalents were also observed in inversion homozygotes and heterozygotes and in the normal ditelocentric (1RL/1RL). The frequencies of association of each chromosome arm are given in Table 1. The highest frequencies correspond to lines with the standard chromosome 1R conformation. The inversion caused a considerable reduction in the frequency of bonds in the long arm and changed their position in the chromosome. In normal homozygotes (1R/1R and 1RL/1RL), all bonds between the 1RL arms were distal or subdistal (Fig. 2A, B), they were proximal in inversion homozygotes (1R<sub>inv</sub>/1R<sub>inv</sub> and 1RL<sub>inv</sub>/1RL<sub>inv</sub>) (Fig. 2C–E), and distal/proximal in the heterozygotes (1R/1R<sub>inv</sub> and 1RL/1RL<sub>inv</sub>) (Fig. 2F, H). However, chromatin condensation made it difficult to determine the number of chiasmata formed in each bivalent and their exact physical positions.

Chiasma frequency can be estimated in heterozygotes for paracentric inversions (inversions like that of 1RL, which do not include the centromere) from anaphase I (AI) observations. When a single crossover takes place in the inverted segment in such heterozygotes, a bridge+acentric fragment configuration appears at anaphase I (AI) (Fig. 3, Fig. 4). The frequency of bridge+acentric fragment involving the 1RL arm in two-armed and ditelocentric heterozygotes (1R/1R<sub>inv</sub> and 1RL/1RL<sub>inv</sub>) appears in Table 1. Close correspondence between the frequency of association at MI and the frequency of recombination, as detected by the bridge+acentric fragment configuration at AI ( $\chi^2 = 0.04$ , freedom degrees = 1,  $p > 0.80$ , for 1R/1R<sub>inv</sub> and  $\chi^2 = 1.17$ ,

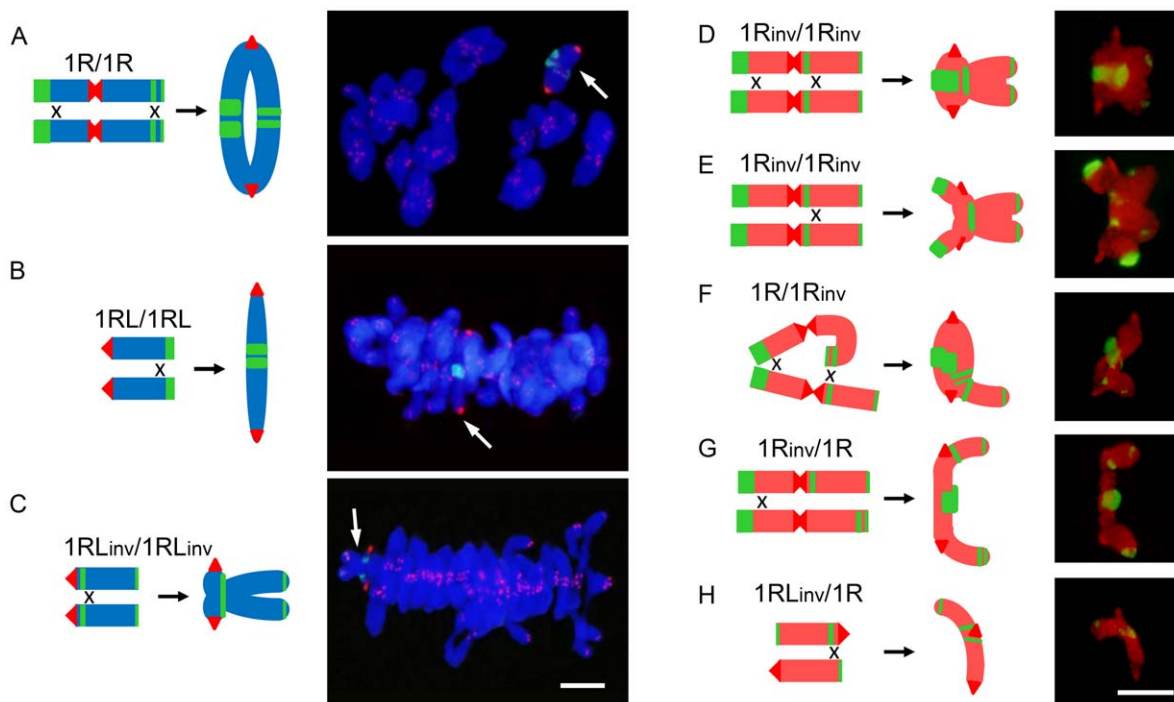
**Table 1.** Frequency (%) of association of rye chromosome arms 1RL and 1RS at metaphase I in the six wheat-rye lines studied and frequency (%) of bridge+acentric fragment configuration at anaphase I in heterozygotes for the inversion.

Line	Metaphase I			Anaphase I	
	1RS	1RL	PMCs	Bridge+fragment	PMCs
1R/1R	91.1	98.9	90		
1R <sub>inv</sub> /1R <sub>inv</sub>	66.7	62.1	66		
1R/1R <sub>inv</sub>	82.8	20.0	320	20.6	320
1RL/1RL		95.1	102		
1RL <sub>inv</sub> /1RL <sub>inv</sub>		78.8	137		
1RL/1RL <sub>inv</sub>		53.4	318	47.3	317

doi:10.1371/journal.pone.0036385.t001

freedom degrees = 1,  $p > 0.50$ , for 1RL/1RL<sub>inv</sub>) indicates that bonds at MI were due to chiasmata.

The bridge+acentric fragment configuration provided no information on the crossover situation in the two-armed heterozygote (1R/1R<sub>inv</sub>). The numbers and positions of chromomeres in such structures were the same, regardless of the crossover position (Fig. 3, Fig. 4A, B). The infrequent AI PMCs showing two bridges and two fragments indicated a very low frequency of complementary (four chromatid) double crossovers in the two-armed heterozygote (1R/1R<sub>inv</sub>). However, heterozygosity for the subdistal marker in the ditelocentric inversion heterozygote (1RL/1RL<sub>inv</sub>) offered a chance to identify the crossover site, either



**Figure 2. Proximal and distal chiasma location between bi-armed or telocentric rye chromosomes and morphology of bivalents formed at metaphase I in different wheat-rye introgressed lines.** Drawings show the position of chiasmata in each bivalent. **A–C** The rye bivalent (arrow) was identified by FISH with the rye centromere DNA probe pAWRC.1 (strong red signals) and probe pSc74 (green). Telomeres (weak red signals) of all chromosomes were also labeled. Both wheat and rye chromosomes were stained with DAPI. **D–H** Rye bivalents identified with rye specific DNA probes pUCM600 (red) pAWRC.1 (bright red) and pSc74 (green). Bars represent 10  $\mu$ m. doi:10.1371/journal.pone.0036385.g002



Line	Crossover position	Bridge + fragment	Frequency (%)
1R/1R <sub>inv</sub>			64/320 (20.0)
			2/320 (0.6)
1RL/1RL <sub>inv</sub>			92/317 (29.0)
			5/317 (1.6)
			31/317 (9.8)
			1/317 (0.3)
			10/317 (3.2)
			3/317 (0.9)
			5/317 (1.6)

**Figure 3. Position and frequency of crossovers that originated each type of bridge and fragment configuration observed at anaphase I in heterozygotes 1R/1R<sub>inv</sub> and 1RL/1RL<sub>inv</sub>.**  
doi:10.1371/journal.pone.0036385.g003

between the centromere and the proximal chromomere of the inverted chromosome or outside this segment. The number and position of chromomeres in the bridges and acentric fragments at AI change with the crossover position (Fig. 3). A crossover between the centromere and the chromomere results in a three-signal fragment (Fig. 4C, D) while a crossover outside this segment gives rise to a fragment with two signals (Fig. 4E, F). The fragment size equals the 1RL arm length regardless of the crossover position. Two complementary crossovers produced in the same side of the proximal chromomere generate two bridges and two acentric fragments with the labeling patterns as indicated above (Fig. 4G, H). Disparate (three chromatid) double crossover located in the same side of the chromomere could not be identified as they produce the same result at AI as a single crossover. Reciprocal (two chromatid) double crossovers could not be detected as they produce no bridge+fragment configuration at AI. Complementary and disparate double crossovers situated at both sides of the chromomere, which render a diagnostic bridge+fragment labeling, were also detected (Fig. 3).

The crossover frequency in the segment between the centromere and the proximal chromomere was 36.3% and 15.8% in the remainder of the chromosome. This means that 70% all crossovers formed in the arm are located in the very short chromosome segment flanked by the centromere and the proximal chromomere of the inverted chromosome, which has its counterpart in the distal

region of the standard chromosome. This segment represents 10% of the pachytene 1RL arm length. The remaining crossovers most likely occur in the immediate vicinity of this segment, as deduced from the proximal position of bonds at MI.

### Dynamics of the rye centromere and distal marker at early and mid prophase I

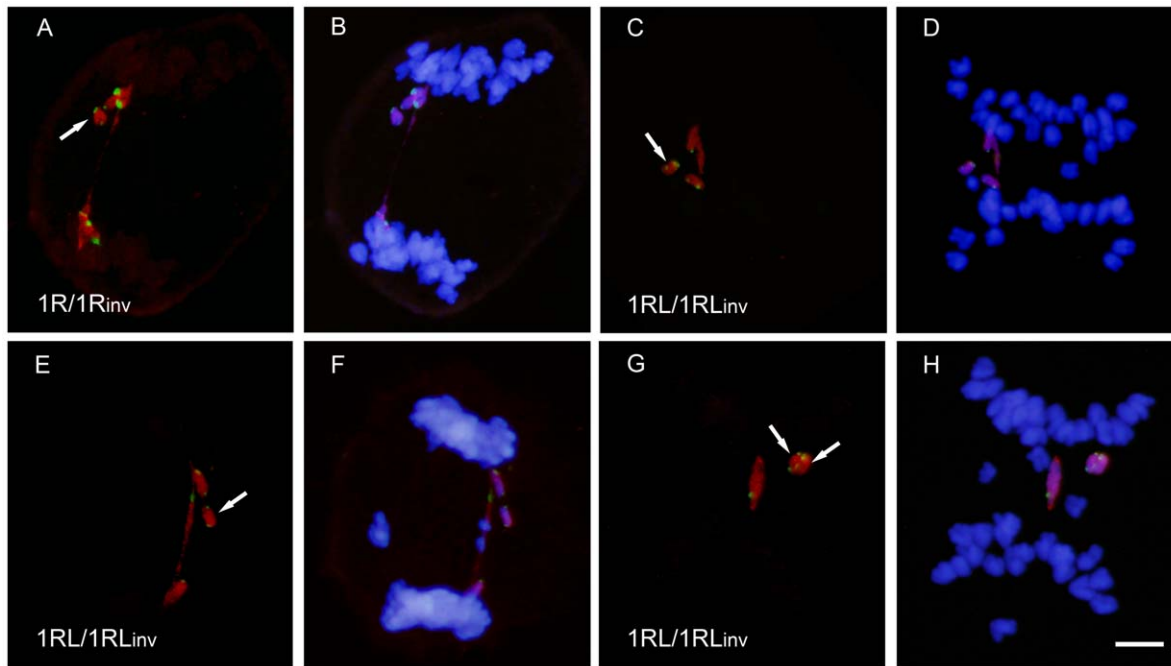
To establish the role that distal and proximal chromosome arm regions play in homology recognition, chromosome pairing and synapsis, the dynamics of the heterochromatic chromomeres and the centromere of the rye chromosome pair were analyzed in meiocytes in stages from early leptotene to pachytene. Meiocyte staging was inferred from the arrangement of telomeres (Fig. 5, S1). In leptotene, telomeres migrate to form a tight cluster and centromeres appear as compact structures located in the opposite pole of the nucleus. In addition, chromatin undergoes a conformational change that results in chromosome elongation [31] which is apparent in centromere signals at the leptotene-zygotene transition. The telomere bouquet is consolidated at the leptotene-zygotene transition and disintegrates at mid zygotene. Late zygotene and pachytene are postbouquet stages that differ in the degree of chromatin condensation. The change of chromatin conformation produced at leptotene showed that the subtelomeric chromomere of 1RS (Fig. 1) subdivides in two, which condense again in one at late zygotene (Fig. 5D, H).

The analysis of the dynamics of homologous chromomeres and centromeres in the course of prophase I was based on changes in the relative position. Two positional categories were considered: absence of association and close physical association. Homologous markers visualized as two FISH signals located at a physical distance higher than 1  $\mu$ m were scored as non-associated; markers were scored as associated when only the two were fused into one signal, or two touching signals were observed. Examples of associated and non-associated markers are shown in Figure 5.

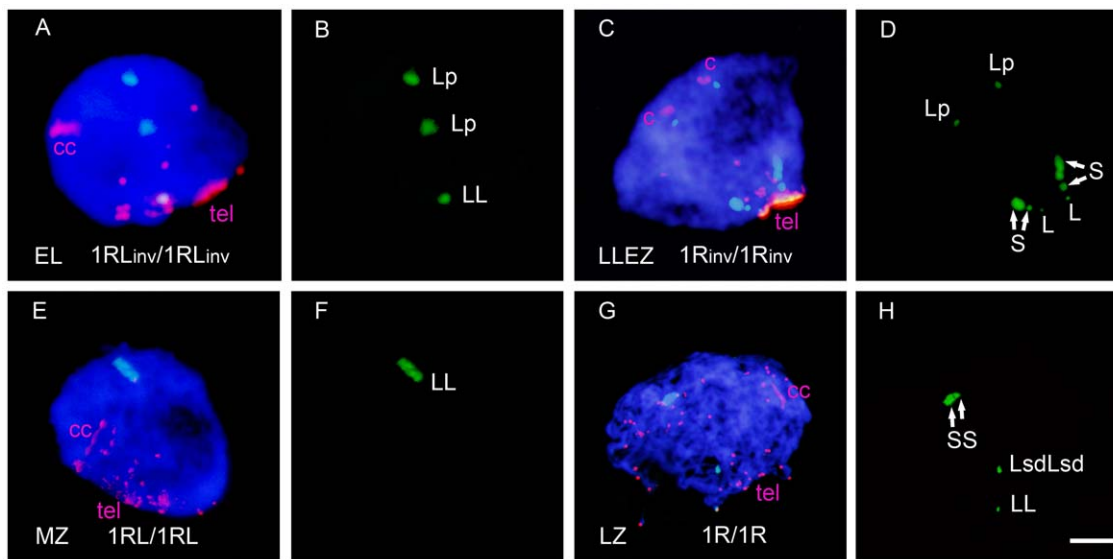
The distal marker of the 1RS arm, which is not involved in the inversion, behaved the same in the three types of plants studied. Its frequency of association was relatively low at the early leptotene but it increased with telomere clustering at the leptotene-zygotene transition, and especially with the progression of synapsis during zygotene, and reached frequencies close to 100% at pachytene (Fig. S2).

The behavior of the distal marker on 1RL was affected by the inversion (Fig. 6). In homozygotes for normal arms (1R/1R and 1RL/1RL), the frequency of association of the distal 1RL chromomere, increased throughout the bouquet consolidation and with progression of synapsis, reaching values close to 100% at pachytene. However, inversion homozygotes had the association frequency at pachytene below 70% and even some reduction of the frequency of association after mid zygotene was observed in the ditelocentric homozygote (1RL<sub>inv</sub>/1RL<sub>inv</sub>). This behavior suggests synapsis failure in the distal crossover-poor regions of the 1RL<sub>inv</sub> chromosome arm. In heterozygotes, the increase in the association frequency of the distal 1RL chromomere, coincident with the telomere clustering produced at the leptotene-zygotene transition, was followed of a reduction during the synaptic development that caused almost complete disappearance of the initial associations in the ditelocentric heterozygote (1RL/1RL<sub>inv</sub>).

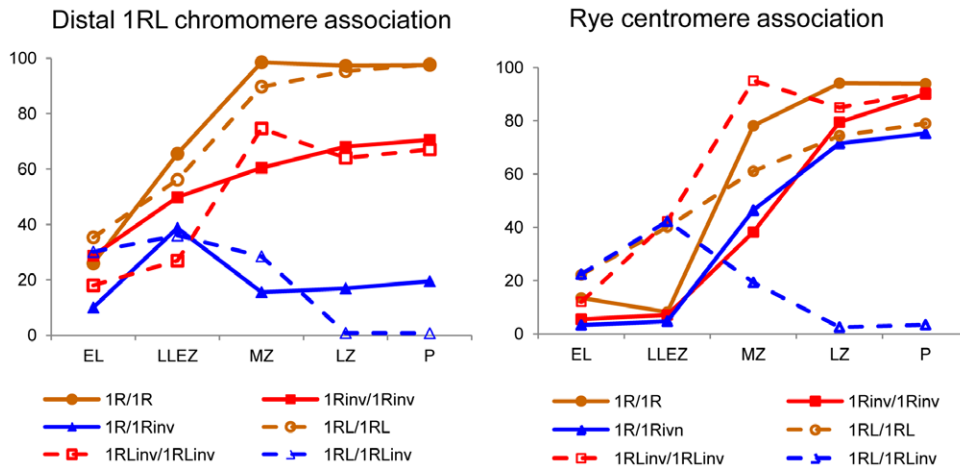
The behavior of centromeres in all lines also is illustrated in Figure 6. Remarkable is the increase of associations at the leptotene-zygotene transition in all three ditelocentric lines, which is absent in lines with two-armed chromosomes. Centromeres of telocentric chromosomes migrate to the telomere pole most likely dragged along by their telomeres during bouquet formation. Hence, they have more opportunities of bringing together than



**Figure 4. Bridge+fragment configurations formed by rye chromosomes at anaphase I in heterozygotes 1R/1R<sub>inv</sub> and 1RL/1RL<sub>inv</sub>.** Rye chromosomes were identified with DNA probes pUCM600 (red) pAWRC.1 (red) and pSc74 (green) (A, C, E, G). Wheat chromosomes were stained with DAPI (B, D, F, H). A,B) Bridge and fragment formed after one crossover between the long arms of 1R and 1R<sub>inv</sub>. C–D) Bridge and three green signals fragment formed by telos 1RL and 1RL<sub>inv</sub> after one crossover flanked by the centromere and the proximal heterochromatic chromomere of 1RL<sub>inv</sub>. E, F) Bridge and two green signals fragment formed after one crossover flanked by the proximal and distal chromomeres of 1RL<sub>inv</sub>. G, H) Two bridges and two fragments after two complementary crossovers located at both sides of the proximal chromomere of 1RL<sub>inv</sub>. Bar represents 10 μm. doi:10.1371/journal.pone.0036385.g004



**Figure 5. Arrangement of telomeres (tel), rye centromeres (c), and rye heterochromatic chromomeres at early and mid prophase I stages in different rye chromosome combinations.** Distal chromomeres of 1RS and 1RL are named S and L, respectively, Lsd designates the subdistal chromomere of the 1RL arm, and Lp the proximal chromomere of 1RL<sub>inv</sub>. A–B) Cell at early leptotene (EL) with several telomere groups showing association of the centromeres and distal chromomeres of 1RL<sub>inv</sub>, and separation of the proximal chromomeres. Centromere signals are larger than any telomere signals located in the opposite hemisphere. C–D) Cell at the leptotene-zygotene transition (LLEZ) showing a bipolar arrangement of the rye centromeres and the telomere cluster that denotes the bouquet formation. Both centromeres and heterochromatic chromomeres are separated. The S marker appears divided in two unequal subchromomeres (arrows) owing to chromosome elongation. E–F) Cell at mid zygotene (MZ) with the bouquet partially disorganized. Centromeres and distal chromomeres are associated. G–H) Cell at late zygotene (LZ) with bouquet dissolution. The 1RS subchromomeres (arrows) are joined because of chromatin condensation; all markers are associated. Bar represents 10 μm. doi:10.1371/journal.pone.0036385.g005



**Figure 6. Frequency (%) of association of the distal chromomeres and centromeres of 1RL in early and mid prophase I in the six wheat-rye lines studied.** Mean number of PMCs =  $159 \pm 22$ .  
doi:10.1371/journal.pone.0036385.g006

centromeres of bi-armed chromosomes, which remain at the centromere pole. The levels of centromere associations increased with the progression of synapsis in the ditelocentric homozygotes, but homozygotes for the inversion reached a higher level of association than normal homozygotes. Thus, the centromere behavior changes with the proximity of the crossover-rich region. In contrast with homozygotes, most centromere associations present at the bouquet stage in the ditelocentric heterozygote ( $1RL/1RL_{inv}$ ) were dissolved in zygotene. Centromere and distal marker behave the same in the ditelocentric heterozygote. Among the lines with two-armed chromosomes, the final frequency of association was higher than 90% in the two homozygotes, although associations of the centromeres of inversion chromosomes were delayed relative to that of standard chromosomes, and close to 80% in the heterozygote. The different behaviors of centromeres in the two types of heterozygotes is most likely the result of the presence or absence of a short arm. Association of centromeres of the two-armed chromosomes could be produced as an extension of the short arm synapsis.

#### Development of synapsis of the rye chromosome pair

To confirm the effect that the inversion of crossover-rich and crossover-poor chromosome regions caused in the synaptic pattern, we quantified the progression of synapsis in meiocytes at zygotene and pachytene. Cells studied were grouped in three classes: PMCs with asynapsis (synapsis level = 0%), PMCs with partial synapsis (synapsis level < 90%), and PMCs with complete synapsis (synapsis level > 90%). Some examples are shown in Figure 7. Distinction was made between the short and the long arms in the classification of the meiocytes. Only the results of mid zygotene, late zygotene and pachytene are shown as the synapsis level at the leptotene-zygotene transition was low. The 1RS arm completed synapsis in most PMCs at late zygotene in all the three lines, even though the completion was reached somewhat earlier in the standard homozygote than in the other two lines (Fig. S3).

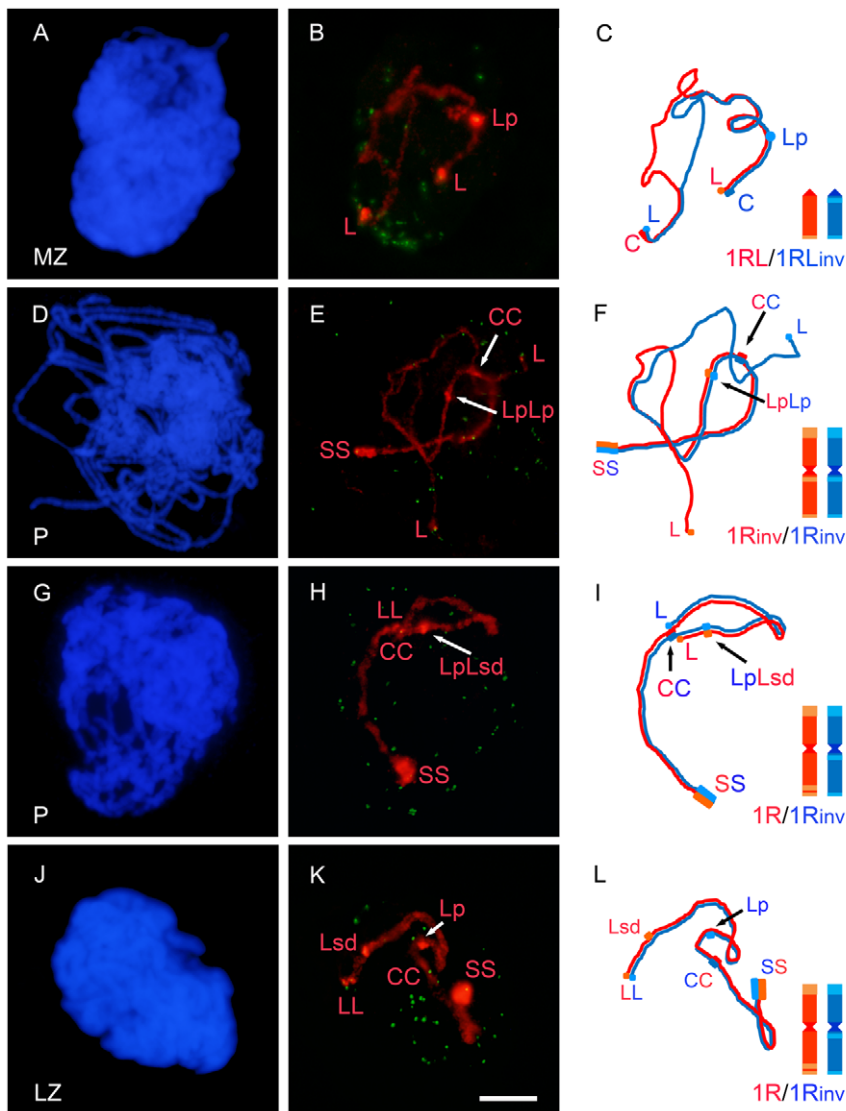
The level of synapsis of the 1RL arm in all of the lines studied appears in Figure 8. Homozygotes for the standard arm structure ( $1R/1R$  and  $1RL/1RL$ ) completed synapsis of 1RL at the end of zygotene in most PMCs. Nevertheless, the number of cells with asynapsis at mid zygotene suggests that the initiation of synapsis was delayed in the ditelocentric heterozygote. The frequency of PMCs with complete synapsis decreased in inversion homozy-

gotes. In addition to some degree (5%–7%) of asynapsis, 31% of PMCs at pachytene, in two-armed homozygotes ( $1R_{inv}/1R_{inv}$ ), and 50% of PMCs, in ditelocentric homozygotes ( $1RL_{inv}/1RL_{inv}$ ), showed partial synapsis. The synaptic pattern indicates that, in the ditelocentric homozygote, progression of synapsis stopped earlier than in the bi-armed homozygote. Heterozygotes showed levels of synapsis lower than homozygotes for the inversion. Only 41% of PMCs at pachytene, in the bi-armed heterozygote ( $1R/1R_{inv}$ ), and 32%, in the ditelocentric ( $1RL/1RL_{inv}$ ), completed synapsis. All of these PMCs developed homologous synapsis in the ditelocentric heterozygote. Among PMCs that completed synapsis at pachytene in the bi-armed heterozygote, only 55% developed homologous synapsis (Fig. 7H, I) while 45% had non-homologous synapsis (Fig. 7K, L).

Matched chromosome segments in PMCs with partial synapsis, in homozygotes for the inversion, concerned either proximal regions or distal regions, or both, but with a different frequency (Table 2). Synapsis failure mainly affected the distal crossover-poor region. In heterozygotes, proximal and distal chromosome segments of 1RL and  $1RL_{inv}$  were found matched in all possible combinations, in PMCs with partial synapsis. These combinations and the number of PMCs scored are also shown in Table 2. Proximal regions of 1RL and  $1RL_{inv}$  were often matched at late zygotene and pachytene in the two-armed heterozygote ( $1R/1R_{inv}$ ), probably as an extension of synapsis produced in the short arm since, in most cases, the synapsed stretch covered only the centromere region. Association of the distal regions was rare at these stages. Among the proximal-distal combinations, synapsis between proximal  $1RL_{inv}$  and distal 1RL was much more frequent than synapsis between distal  $1RL_{inv}$  and proximal 1RL. This result suggests that distal 1RL and proximal  $1RL_{inv}$ , that is to say, the homologous crossover-rich regions, find each other more easily than other arm combinations.

#### Discussion

The study of pairing at MI confirms the change in chiasma location from distal to proximal associated with the inversion of 1RL in homozygotes and heterozygotes [20]. Although this inversion did not affect homology recognition and synapsis of the 1RS arm, pairing of 1RS at MI was reduced in the inversion homozygotes. Such a reduction is line-specific and not affected by the inversion [20]. By contrast, a much higher reduction of



**Figure 7. Synaptic configuration of the rye chromosome pair in cells at mid zygotene (MZ), late zygotene (LZ) and pachytene (P) in different lines. A, D, G, J)** DAPI image of each nucleus. **B, E, H, K)** Arrangement of telomeres labeled with probe pAt74 (green) and of the rye bivalent hybridized with probes, pUCM600, pAWRC.1, pSc74 (red) present in each nucleus. **C, F, I, L)** Schematic representation of the two rye homologues that synapse in each bivalent. **B, C)** 1RL and 1RL<sub>inv</sub> show antiparallel arrangement and synapsis at both ends. **E, F)** Synapsis of the 1R<sub>inv</sub>-1R<sub>inv</sub> pair involves 1RS and the proximal region of 1RL<sub>inv</sub> including the proximal chromomere. **H, I)** Chromosomes 1R and 1R<sub>inv</sub> show complete homologous synapsis. **K, L)** Chromosomes 1R and 1R<sub>inv</sub> underwent homologous synapsis of the short arm and non-homologous synapsis of the long arm. Bar represents 10  $\mu$ m.

doi:10.1371/journal.pone.0036385.g007

metaphase I pairing for the 1RL arm in homozygotes and heterozygotes for the inversion was, in fact, accompanied of failure on homologous recognition and synapsis. The results obtained for the behavior of the centromere and distal marker of 1RL at early meiosis and the synaptic pattern of this arm provide relevant information concerning the dynamics of regions with high and low crossover frequency in the partner identification and initiation and progression of synapsis.

#### Does the crossover distribution observed here apply to a standard 1RL arm?

The absence of chiasmata in the proximal halves of chromosomes is common to many triticeae species including wheat and rye. With respect to the physical mapping of crossovers, this study

has identified a physically short chromosome region that harbors 70% of all crossovers in the ditelocentric heterozygote (1RL/1RL<sub>inv</sub>). The crossover-rich region is flanked by the centromere, on one side, and the proximal chromomere of the inverted chromosome, on the other. At pachytene, it represents 10% of the 1RL<sub>inv</sub> arm length. A homologous segment of comparable length located distally in the 1RL arm is flanked by the distal and subdistal chromomeres in the in the standard two-armed homozygote (1R/1R). Rye chromosomes are polymorphic for these cytological markers, which was used to estimate a frequency of recombination of 3.1% for this segment and 48.7% for the adjacent segment between the subdistal chromomere and a third chromomere situated in the middle of the arm [32]. Some methodological difficulties in identification of parental and recombinant chromosome types could, at least in part, explain

the low recombination frequency in the most distal segment of 1RL.

The crossover frequencies estimated in the ditelocentric heterozygote (1RL/1RL<sub>inv</sub>), are lower than those of the standard 1RL arm, as deduced from the number of bonds at MI. A high resolution genetic map of rye lists 1RL at 74 cM [33]. An estimate of the genetic length of 1RL can also be obtained from the frequency of PMCs with one and two crossover as follows. The genetic length (L) of a chromosome segment where one crossover occurs with frequency  $f_1$ , two crossover with frequency  $f_2$ , three crossovers with frequency  $f_3$ , and so on, can be calculated as  $L = 50(f_1 + 2f_2 + 3f_3 + \dots + nf_n)$  [34]. The frequency of PMCs with one and two crossovers in the 1RL/1RL<sub>inv</sub> heterozygote yields a genetic length of 26.97 cM, or 36% of recombination in the standard 1RL arm. Such a ratio seems to be sufficient to consider the crossovers distribution observed in the inversion heterozygote as representative of the crossover distribution in a standard chromosome arm.

One can argue that wheat chromosomes might affect the number and distribution of crossovers in the 1RL arm. Location of chiasmata in the distal half of the standard 1RL is maintained in the disomic wheat-1R and wheat-1RL introgressed lines. Wheat chromosomes were found to cause a reduction of the number of chiasmata of the 1RL arm only when a large subtelomeric heterochromatin block was present, especially in heterozygous condition. No effect was apparent in the absence of rye subtelomeric heterochromatin [35]. Accordingly, the delay of synapsis initiation detected in the standard ditelocentric (1RL/1RL) could have been generated by the larger size of its distal chromomere. The high degree of chromatin compaction in distal chromomeres may increase resistance to movement during telomere migration and large chromomeres could be expected to move more slowly than small-sized chromomeres.

### Intrachromosomal differentiation of 1RL in the control of homologous pairing, synapsis and recombination

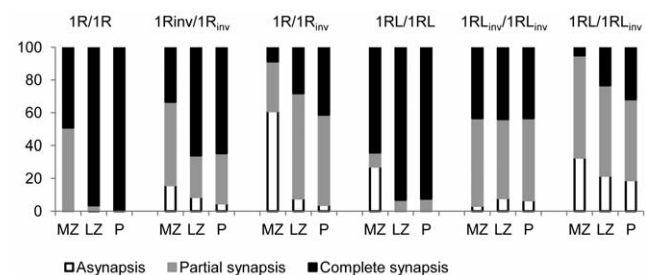
Homozygosity and heterozygosity for the inversion were informative with respect to the different roles that the crossover-rich and crossover-poor regions may play in the search for their homologous partners and in the synaptic development. Homozygosity for the inversion produced synapsis failure in the distal region of the inverted arm, that is, in the region normally with a low crossover frequency. The synaptic failure occurred regardless of whether the accompanying subtelomeric markers were associated or not, which means that such a region was much less efficient than the high crossover frequency region in the processes of homologous alignment and assembly of the synaptonemal complex.

Differences between heterozygotes in the synaptic pattern can be explained by the presynaptic arrangement of chromosomes and a different behavior of centromeres of telocentric and bi-armed chromosomes at the bouquet organization. At the onset of meiosis chromosomes retain the geography of the previous anaphase, the Rabl model [31,36], and the homologous domains of 1RL and 1RL<sub>inv</sub> occupy territories located in opposite poles of the nucleus, that is, one is positioned close to the telomere, hence in the telomeric pole of the nucleus, while the other is by the centromere, hence in the opposite pole (Fig. S1). The initial spatial separation of the homologous distal 1RL and proximal 1RL<sub>inv</sub>, or proximal 1RL and distal 1RL<sub>inv</sub>, regions disappears with the bouquet organization in the case of the telocentric chromosomes; telomere clustering obliges the centromere of telocentric chromosomes to move to the telomere pole [31,36]. This chromosome movement facilitates the occurrence of interactions between homologous

regions and only homologous synapsis is produced. However, interactions leading to stable synapsis occur more often between the crossover-rich distal 1RL and proximal 1RL<sub>inv</sub> regions than between the crossover-poor combination.

The situation is completely different in the bi-armed heterozygote (1R/1R<sub>inv</sub>), in which, the antiparallel orientation of 1RL and 1RL<sub>inv</sub> was not affected by telomere clustering. Although the telomeric or subtelomeric homologous stretches of 1RL and 1RL<sub>inv</sub> not included in the inversion may interact at the bouquet stage, the progression of synapsis toward the chromosome center is complicated by the absence of homology. Nevertheless, approximately one half of completely synapsed bivalents at pachytene concluded their non-homologous synapsis. Chromosomes that do not find the homologous partner may synapse non-homologously, as it happens in haploid rye [37]. However, homologous regions of the bi-armed chromosomes located in opposite poles of the nucleus were still capable of interactions in cells with homologous synapsis. Such homologous interactions must depend on chromosome movements generated by a mechanism different of telomere clustering. Concomitant with bouquet organization, chromatin undergoes a decondensation process that leads to approximately a five-folds enlargement of the chromosome length [31,36]. This chromatin remodeling does not increase the nuclear size, hence the elongated chromosomes must move and may span the entire nucleus. These chromosome movements, assumed to occur without any programmed orientation, may generate chance encounters between homologous regions, even if they initially located at very distant spatial territories of the nucleus. Such interactions occur also more often between crossover-rich regions than between crossover-poor regions.

Thus, the distal 10% of the 1RL arm not only harbors a good part of all crossovers produced in this arm, but it is also essential in the search for the homologous partner and the initiation, and development, of synapsis. This implies that chromosome pairing synapsis and crossing over are DNA sequence-dependent. In addition, they are interconnected by the multifunctional activity of recombination proteins Mer3, Msh4 and Mlh1. These proteins that are implicated in recombinational interactions of the crossover pathway during the leptotene/zygotene transition, zygotene and pachytene, play also a direct role in partner identification and chromosome pairing [38]. The existence of a specific region involved in all three processes: homologous pairing, synapsis and crossing over, and of other regions that do not seem to be involved with any of the three, indicates an intrachromosomal differentiation of 1RL in the control of meiotic events. Whether this differentiation is specific to just 1RL or some general feature of cereal chromosomes is an open issue. In two reverse



**Figure 8. Frequency (%) of PMCs with asynapsis, partial synapsis or complete synapsis of the 1RL arm in the six types of plants studied.** Among PMCs of the 1R/1R<sub>inv</sub> heterozygote with complete synapsis, 45% showed non-homologous synapsis and 55% homologous synapsis. Mean number of PMCs = 119 ± 16. doi:10.1371/journal.pone.0036385.g008



**Table 2.** Matched regions in meiocytes with partial synapsis at mid zygotene (MZ), late zygotene (LZ) and pachytene (P) in homozygotes and heterozygotes for the inversion.

Line	Stage	Matched regions in homozygotes							Total PMCs
		pi-pi	di-di	pi-pi+ di-di					
1R <sub>inv</sub> /1R <sub>inv</sub>	MZ	41	25	20				138	
	LZ	41	2	0				126	
	P	35	7	0				107	
1RL <sub>inv</sub> /1RL <sub>inv</sub>	MZ	28	5	32				122	
	LZ	30	8	10				100	
	P	36	3	14				106	
		Matched regions in heterozygotes							
		pn-pi	dn-di	pn-pi+ dn-di	pn-di	pi-dn	pn-di+ pi-dn		
1R/1R <sub>inv</sub>	MZ	0	5	11	6	10	0	105	
	LZ	62 <sup>a</sup>	0	5	0	31	0	153	
	P	45 <sup>a</sup>	0	0	0	28	0	133	
1RL/1RL <sub>inv</sub>	MZ	14	31	24	5	25	19	186	
	LZ	3	3	2	0	60	1	125	
	P	1	5	0	0	66	1	148	

p = proximal; d = distal; n = 1RL; i = 1RL<sub>inv</sub>.<sup>a</sup>Synapsis covered only the centromere region in 74% of PMCs at MZ and 89% of PMCs at P.

doi:10.1371/journal.pone.0036385.t002

tandem duplications in wheat involving almost complete arms, chiasma locations were restricted to the same exact positions as in structurally normal arms; long regions of arms that in a normal arm are proximal and which were placed by the duplication-inversion at the telomeres, were never involved in chiasma formation, very much like the 1RL here [39]. The long arm of rye chromosome 5R also shows distal or subdistal chiasmata but the role of its proximal part seems to be different than in 1RL; deletion of the crossover-rich distal region of 5RL does not affect pairing and synapsis of the remaining portions of the chromosome [29].

### Bouquet disorganization accompanies pairing and synapsis correction

Our results address not only the dynamics of the presynaptic chromosome movements with respect to the homology search and synaptic development but also the chromosome movements following the initiation of synapsis. Dispersion of the chromosome ends during bouquet dissolution can be counted among intranuclear meiotic movements. Separation of telomeres during zygotene is accompanied by a reduction in the level of association of the distal chromomeres in heterozygotes, while the proximal and distal homologous regions continue to interact. All associations detected at the leptotene-zygotene transition between the terminal chromomeres in the ditelocentric heterozygote, and half of those produced in the bi-armed heterozygote (1R/1R<sub>inv</sub>), did not develop stable synapsis and were lost with the telomere dispersion (Fig. 6). Likewise, most of the centromere associations observed at the bouquet stage in the ditelocentric heterozygote (1RL/1RL<sub>inv</sub>) disappeared during zygotene. Such a behavior suggests that bouquet dissolution facilitates a correction of pairing and synapsis by elimination of improper and unstable chromosome associations, allowing homologues to develop more stable interactions.

The difference between stable and unstable associations might depend on the capability that they have to form a crossover or not.

This is likely the pairing correction mechanism that operates in polyploid wheats, where homologous and homoeologous chromosomes compete for pairing at the onset of meiosis, and a considerable number of multivalents can be observed at the early and mid zygotene. Such multivalents formed by homologous and homoeologous chromosomes are reduced to homologous bivalents at late zygotene and pachytene in the wild *Ph1* genotype [21,40–41]. The *Ph1* locus is responsible for the diploid-like behavior of polyploid wheats, which form only bivalents at MI. Chiasmata are formed only between homologous chromosomes in the presence of *Ph1* but, when *Ph1* is absent, chiasmata can also be formed between homoeologues, and multivalents persist until MI [42–43]. Restriction of crossovers to homologous chromosomes in the wild type wheat may be responsible of the instability of homoeologous synapsis, which disappears during the bouquet dissolution stage, thus facilitating completion of synapsis between homologous chromosomes. In the absence of *Ph1*, the repair of DSBs via crossover between homoeologues is permitted, stabilizing homoeologous synapsis in the prophase I multivalents, which therefore can reach MI.

## Materials and Methods

### Plant material

Six wheat-rye introgression lines were used in this study. Three of these lines carried the chromosome pair 1R of rye (*S. cereale*), and the other three had two telocentrics for the 1RL arm, introgressed in the genetic background of hexaploid wheat, *Triticum aestivum*. Each set of three lines consisted of homozygotes for the standard chromosome structure (1R/1R and 1RL/1RL, respectively), homozygotes for the inversion of 1RL (1R<sub>inv</sub>/1R<sub>inv</sub> and 1RL<sub>inv</sub>/1RL<sub>inv</sub>, respectively), and heterozygotes (1R/1R<sub>inv</sub>

and 1RL/1RL<sub>inv</sub>, respectively). Chromosome stocks 1R/1R, 1R<sub>inv</sub>/1R<sub>inv</sub>, 1RL<sub>inv</sub>/1RL<sub>inv</sub> and two progenies of the 1RL/1RL<sub>inv</sub> heterozygote were generated in the genetic background of hexaploid wheat cv. Pavon 76, as substitutions for chromosome 1A, by A.J. Lukaszewski, Univ. of California, Riverside, USA [20], and provided to the authors for further study. The 1RL/1RL<sub>inv</sub> heterozygote studied was isolated among the above two progenies and the 1R/1RL<sub>inv</sub> heterozygote was obtained in a cross between homozygotes 1R/1R and 1R<sub>inv</sub>/1R<sub>inv</sub>. The wheat-1RL/1RL homozygote is a ditelocentric line derived from the Chinese Spring-1R addition line [44]. All plants used were grown in a greenhouse from November to May under natural light. At meiosis, one of the three anthers of each flower was checked to establish the meiotic stage and the other two were fixed in 3:1 ethanol acetic acid, and stored at 4°C.

### Fluorescence in situ hybridization

Fixed anthers were digested in a pectolytic enzyme mixture, transferred to a clean slide and pretreated as previously described [31]. For the study of the arrangement of centromeres and heterochromatic chromomeres of rye chromosomes at prophase I, the following DNA probes were used: clone pAWRC.1 containing a rye-specific centromere repeat [45], clone pSc74 containing a rye-specific 480-bp tandem repeat [46–47] and clone pAt74 containing the *Arabidopsis* telomere tandem repeat [48]. For the study of synapsis a fourth DNA probe containing a rye-specific repeat, clone pUCM600 [30], was added. Rye chromosomes at MI were identified with all three rye-specific DNA probes pSc74 and pAWRC.1 and pUCM600, or only with pSc74 and pAWRC.1. Anthers at anaphase I-telophase I of heterozygotes 1R/1R<sub>inv</sub> and 1RL/1RL<sub>inv</sub> were analyzed with probes pUCM600, pSc74 and pAWRC.1. Probe concentrations in the different hybridization mixes were 5 ng/μl, for pAt74, and 10 ng/μl, for probes pAWRC.1, pSc74 and pUCM600. Probe pAt74 that labels both wheat and rye telomeres was used in the identification of the prophase I stage as previously described [29,49].

All clones were labeled by nick translation with biotin-16-dUTP or digoxigenin-11-dUTP. In the analysis of the position of centromeres and chromomeres of rye chromosomes, probes pAt74 and pAWRC.1 were labeled with biotin-16-dUTP and probe pSc74 with digoxigenin-11-dUTP. In the analysis of synapsis, rye-specific DNA probes pAWRC.1, pSc74, and pUCM600 were labeled with biotin-11-dUTP and the telomeric DNA probe pAt74 with digoxigenin-11-dUTP. In the analysis of recombination at anaphase I-telophase I, probes pUCM600 and pAWRC.1 were labeled with biotin-11-dUTP and probe pSc74

with digoxigenin-11-dUTP. The digoxigenin-labelled probes were detected with 6–8 ng/μl of the FITC-conjugated antidigoxigenin antibody (Sigma, St Louis) in 4B (0.5% blocking reagent in 4×SSC) and biotin-labelled probes with 10–15 ng/μl of the Cy3-conjugated avidine (Sigma) in 4B.

Images of cells were viewed under an Olympus BX60 fluorescence microscope equipped with an Olympus DP70 CCD camera. Images were optimized for brightness and color using Adobe Photoshop CS4.

### Supporting Information

**Figure S1 Arrangement of rye chromosomes at early meiosis in two-armed (A) and ditelocentric (B, C) inversion heterozygotes.** A–B) Nuclei at early leptotene (EL) with rye chromosomes (red) positioned in separated territories. The arms 1RL and 1RL<sub>inv</sub> show antiparallel orientation as it is indicated in the diagrams. Rye chromatin is still highly compacted and telomeres (green) form several miniclusters. C) Nucleus at the leptotene-zigotene transition (LLEZ) with a tight telomere cluster and apparent chromatin decondensation. The centromere of 1RL remains at the centromere pole while the centromere of 1RL migrated to the telomere pole. Bar represents 10 μm. (TIF)

**Figure S2 Frequency (%) of association of the distal IRS chromomere pair in early and mid prophase I in plants 1R/1R, 1R<sub>inv</sub>/1R<sub>inv</sub> and 1R/1R<sub>inv</sub>.** EL, early leptotene; LLEZ, late leptotene-early zygotene; MZ, mid zygotene; LZ, late zygotene; P, pachytene. Mean number of PMCs = 181 ± 32. (TIF)

**Figure S3 Frequency (%) of PMCs with asynapsis, partial synapsis or complete synapsis of the IRS arm in plants 1R/1R, 1R<sub>inv</sub>/1R<sub>inv</sub> and 1R/1R<sub>inv</sub>.** Mean number of PMCs = 126 ± 20. (TIF)

### Acknowledgments

We are grateful to A.J. Lukaszewski, Univ. of California, Riverside, USA, for kindly supplying chromosome stocks used in this work, and for critical review of the manuscript.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NTV TN. Performed the experiments: NTV EP TN. Analyzed the data: NTV EP TN. Wrote the paper: NTV TN.

### References

- Hunter N (2006) Meiotic recombination. In: Aguilera A, Rothstein R editors. Molecular genetics of recombination. Berlin: Springer-Verlag. pp 381–442.
- Naranjo T, Corredor E (2008) Nuclear architecture and chromosome dynamics in the search of the pairing partner in meiosis in plant. Cytogenet Genome Res 120: 320–330.
- Bass HW, Marshall WF, Sedat JW, Agard DA, Cande WZ (1997) Telomeres cluster de novo before the initiation of synapsis: a three-dimensional spatial analysis of telomere positions before and during meiotic prophase. J Cell Biol 137: 5–18.
- Bass HW, Riera-Lizarazu O, Ananiev EV, Bordoli SJ, Rines HW, et al. (2000) Evidence for the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. J Cell Sci 113: 1033–1042.
- Niwa O, Simanuki M, Miki F (2000) Telomere-led bouquet formation facilitates homologous chromosome pairing and restricts ectopic interactions in fission yeast meiosis. EMBO J 19: 3831–3840.
- Trelles-Sticken E, Dresser ME, Scherthan H (2000) Meiotic telomere protein Ndj1p is required for meiosis-specific telomere distribution, bouquet formation and efficient homologous pairing. J Cell Biol 151: 95–106.
- Cowan CR, Carlton PM, Cande WZ (2001) The polar arrangement of telomeres in interphase and meiosis: Rabl organization and the bouquet. Plant Physiol 125: 532–538.
- Scherthan H (2001) A bouquet makes ends meet. Nat Rev Mol Cell 6: 975–987.
- Harper L, Golubovskaya I, Cande WZ (2004) A bouquet of chromosomes. J Cell Sci 117: 4025–4032.
- Pawlowski WP, Cande WZ (2005) Coordinating the events of the meiotic prophase. Trends Cell Biol 15: 664–681.
- Petes TD (2001) Meiotic recombination hot spots and cold spots. Nat Rev Genet 2: 360–369.
- Kauppi L, Jeffreys AJ, Keeney S (2004) Where the crossovers are: recombination distributions in mammals. Nat Rev Genet 5: 413–424.
- Pan J, Sasaki M, Kniewel R, Murakami H, Blitzblau HG, et al. (2011) A hierarchical combination of factors shapes the genome-wide topography of yeast meiotic recombination initiation. Cell 144: 719–731.
- Smagulova F, Gregoret IV, Brick K, Khil PL, Camerini-Otero RD, et al. (2011) Genome-wide analysis reveals novel molecular features of mouse recombination hotspots. Nature 472: 375–378.

15. Mézard C, Vignard J, Drouaud J, Mercier R (2007) The road to crossovers: plants have their say. *Trends Genet* 23: 91–99.
16. Lukaszewski AJ, Curtis CA (1993) Physical distribution of recombination in B-genome chromosomes of tetraploid wheat. *Theor Appl Genet* 86: 121–127.
17. Akhunov ED, Goodyear AW, Geng S, Qi LL, Echalié B, et al. (2003) The organization and rate of evolution of wheat genomes are correlated with recombination rates along chromosome arms. *Genome Res* 13: 753–763.
18. Anderson LK, Salameh N, Bass HW, Harper LC, Cande WZ, et al. (2004) Integrating genetic linkage maps with pachytene chromosome structure in maize. *Genetics* 166: 1923–1933.
19. Künzel G, Korzun L, Meister A (2000) Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics* 154: 397–712.
20. Lukaszewski AJ (2008) Unexpected behaviour of an inverted rye chromosome arm in wheat. *Chromosoma* 117: 569–578.
21. Holm PB (1986) Chromosome pairing and chiasma formation in allohexaploid wheat, *Triticum aestivum* analyzed by spreading of meiotic nuclei. *Carlsberg Res Commun* 51: 239–294.
22. Gillies CB (1975) An ultrastructural analysis of chromosome pairing in maize. *CR. Trav. Lab Carlsberg* 40: 135–161.
23. Gillies CB (1985) An electron microscopical study of synaptonemal complex formation at zygotene in rye. *Chromosoma* 92: 165–175.
24. Curtis CA, Lukaszewski AJ, Chrzastek M (1991) Metaphase-I pairing of deficient chromosomes and genetic mapping of deficiency breakpoints in wheat. *Genome* 34: 553–560.
25. Endo TR, Mukai Y, Yamamoto M (1991) Physical mapping of a male-fertility gene of common wheat. *Jpn J Genet* 66: 201–205.
26. Lukaszewski AJ (1995) Physical distribution of translocation breakpoints in homocologous recombinants induced by the absence of the *Ph1* gene in wheat and triticale. *Theor Appl Genet* 90: 714–719.
27. Jones LE, Rybka K, Lukaszewski AJ (2002) The effect of a deficiency and a deletion on recombination in chromosome 1BL in wheat. *Theor Appl Genet* 104: 1204–1208.
28. Qi LL, Friebe B, Gill BS (2002) A strategy for enhancing recombination in proximal regions of chromosomes. *Chromosome Res* 10: 645–654.
29. Naranjo T, Valenzuela N, Perera E (2010) Chiasma frequency is region-specific and chromosome conformation-dependent in a rye chromosome added to wheat. *Cytogenet Genome Res* 129: 133–142.
30. González-García M, Cuacos M, González-Sánchez M, Puertas MJ, Vega JM (2011) Painting the rye genome with genome-specific sequences. *Genome* 54: 555–564.
31. Maestra B, De Jong JH, Shepherd K, Naranjo T (2002) Chromosome arrangement and behaviour of two rye telosomes at the onset of meiosis in disomic wheat-5RL addition lines with and without the *Ph1* locus. *Chromosome Res* 10: 655–667.
32. Lukaszewski AJ (1992) A comparison of the physical distribution of recombination in chromosome 1R in diploid rye and in hexaploid triticale. *Theor Appl Genet* 83: 1048–1053.
33. Gustafson JP, Ma XF, Korzun V, Snape JW (2009) A consensus map of rye integrating mapping data from five mapping populations. *Theor Appl Genet* 118: 793–800.
34. Lacadena JR (1981) *Genética*. Madrid: AGESA. 1.303 p.
35. Naranjo T, Lacadena JR (1980) Interaction between wheat chromosomes and rye telomeric heterochromatin on meiotic pairing of chromosome pair 1R of rye in wheat-rye derivatives. *Chromosoma* 81: 249–261.
36. Corredor E, Naranjo T (2007) Effect of colchicine and telocentric chromosome conformation on centromere and telomere dynamics at meiotic prophase I in wheat-rye additions. *Chromosome Res* 15: 231–245.
37. de Jong JH, Havekes F, Roca A, Naranjo T (1991) Synapsis and chiasma formation in a ditelo-substituted haploid of rye. *Genome* 34: 109–120.
38. Storlazzi A, Gargano S, Ruprich-Robert G, Falque M, David M, et al. (2010) Recombination proteins mediate meiotic spatial chromosome organization and pairing. *Cell* 141: 94–106.
39. Lukaszewski A (2011) Inversions of chromosome arms 4AL and 2BS in wheat invert the patterns of chiasma distribution. *Chromosoma* 121: 201–208.
40. Hobolth P (1981) Chromosome pairing in allohexaploid wheat var. Chinese Spring. Transformation of multivalents into bivalents, a mechanism for exclusive bivalent formation. *Carlsberg Res Commun* 46: 129–173.
41. Martínez M, Naranjo T, Cuadrado C, Romero C (2001) The synaptic behaviour of *Triticum turgidum* with variable doses of the *Ph1* locus. *Theor Appl Genet* 102: 751–758.
42. Holm PB, Wang X (1988) The effect of chromosome 5B on synapsis and chiasma formation in wheat, *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring. *Carlsberg Res Commun* 53: 191–208.
43. Luo MC, Dubcovsky J, Dvorák J (1996) Recognition of homeology by the wheat *Ph1* locus. *Genetics* 144: 1195–1203.
44. Driscoll CJ, Sears ER (1971) Individual addition of the chromosomes of Imperial rye to wheat. *Agron Abstr* 1971: 6. 6 p.
45. Franki MG (2001) Identification of Bilby, a diverged centromeric Ty1-copia retrotransposon family from cereal rye (*Secale cereale* L.). *Genome* 44: 266–274.
46. Bedbrook JR, Jones J, O'Dell M, Thompson R, Flavell RB (1980) A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell* 19: 545–560.
47. Cuadrado A, Schwarzacher T (1998) The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. *Chromosoma* 107: 587–594.
48. Richards EJ, Ausubel SM (1988) Isolation of a higher eukaryotic telomere sequence from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53: 127–136.
49. Corredor E, Lukaszewski AJ, Pachón P, Allen DC, Naranjo T (2007) Terminal regions of wheat chromosomes select their pairing in meiosis. *Genetics* 177: 699–706.